THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

PRESENTEE

à l'Université de Paris Sud Centre d'Orsay

PAR

Madame ROUSSEL GRUBER Annick

pour obtenir le titre de Docteur d'Université

SUJET DE THESE :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PHOSPHALIPASES SANGUINES ET MEMBRANAIRES PAR UN FACTEUR PLAQUETTAIRE CHEZ LE RAT

SOUTENUE LE 1981

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.	CHEVALLIER. F	Président
	DOUSTE-BLAZY. L	Rapporteur
	POLONOVSKI. J	Examinateur

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

PRESENTEE

à l'Université de Paris Sud Centre d'Orsay

PAR

Madame ROUSSEL GRUBER Annick

pour obtenir le titre de Docteur d'Université

SUJET DE THESE :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PHOSPHALIPASES SANGUINES ET MEMBRANAIRES PAR UN FACTEUR PLAQUETTAIRE CHEZ LE RAT

SOUTENUE LE 1981

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM.	CHEVALLIER. F	Président
	DOUSTE-BLAZY. L	Rapporteur
	POLONOVSKI. J	Examinateur

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

PRESENTEE

A L'Universite de Paris Sud Centre d'Orsay

PAR

Madame ROUSSEL GROSEK Annick

pour obtenir le titre de Docteur d'Universite

SUJET DE THESE :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES

PHOSPHOLIPASES SANGUINES ET MEMBRANAIRES

PAR UN FACTEUR PLAQUETTAIRE CHEZ LE RAT

SOUTENUE LE 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. CHEVALLIER. F Président

DOUSTE-BLAZY. L Rapporteur

POLONOVSKI. J Examinateur

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biochimie de Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI, de la Faculté de Médecine Saint-Antoine (Université Paris VI), sous la direction de Madame J. ETIENNE-PETITFILS, Chargée de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique.

Mes remerciements sincères et respectueux

à Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI, qui m'a permis de réaliser ce travail et qui m'a conseillée avec beaucoup de bienveillance et d'amitié,

à Monsieur le Professeur F. CHEVALLIER, qui a accepté aimablement de présider cette thèse,

à Monsieur le Professeur L. DOUSTE-BLAZY, qui a bien voulu examiner ce travail et en être Rapporteur,

à Madame J. ETIENNE-PETITFILS, qui m'a initiée à la biochimie et à qui j'exprime ma profonde gratitude pour les précieux conseils qu'elle m'a donnés.

Ma profonde sympathie à tous mes Amis et Collègues pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

A la mémoire de Madame Marthe PAYSANT.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547321_0020

Que tous mes AMIS qui m'ont aidé pour l'ellaboration de ce texte trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus amicaux.

Plus particulièrement :

ARLETTE SAINT-LEGER , que je remercie de bien avoir voulu se charger de la dactylographie.

DANIELE ESPINET , qui a toujours apporté sa précieuse collaboration au moment nécessaire.

ROGER LEPERS , l'ami de ma famille.

Je remercie, en outre, l'imprimerie de ROUSSEL-UCLAF à la Tour Nobel, qui m'a permis de réaliser la présentation de ma thèse.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

AVANT-PROPOS

La plus grande partie de cette thèse a fait l'objet de 6 publications.

- Apparition dans le sérum de rat d'une activité phospholipasique d'origine érythrocytaire au cours de la coagulation : Rôle des plaquettes.

  ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..

  Paroi Artérielle - Arterial wall (1973) I : 119-123

- Phospholipase et prophospholipase de l'aorte chez le rat.

  ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..

  Paroi Artérielle - Arterial wall (1973) I : 169-172

- Activation in vivo des prophospholipases sanguines et artérielles par un activateur d'origine plaquettaire

  ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..

  Bull. Soc. de Biol. (1976) 170 : 1159-1166

- L'activité phospholipasique A_2 des plaquettes de rat.

  ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..

  Biochimie (1979) 61 : 433-435

- Activité phospholipasique A_2 du sérum de rat. Association de deux protéines.

  ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..

  Biochim. Biophys. Acta. (1980) 619 : 693-698

- Activation des phospholipases sanguines par un activateur qui accompagne la trypsine brute.

  ETIENNE, J., BRETON, M., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..

  Biochimie (1980) 62 : 723-726

P L A N

RÉSUMÉ 4

INTRODUCTION 6

ABRÉVIATIONS 9

TECHNIQUES GÉNÉRALES 10

I - PRELEVEMENTS 10

A. du sang : préparation des lysats

- de plaquettes
- de globules rouges

B. des organes : artères et poumons

- préparation des homogénats

II - METHODES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE 12

- préparation et purification de la phosphatidyléthanolamine marquée au ^{14}C
- conditions d'incubation

III - TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT DES PROTEINES 14

- sur colonnes . de Séphadex G 100
  . de Blue Sépharose CL 6B

RÉSULTATS 15

I - ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES DU RAT 15

A. des phospholipases sanguines

- in vitro
- au cours de la coagulation
- après injection du lysat de plaquettes

B. des phospholipases tissulaires : aorte et poumon

- in vitro
- après injection du lysat de plaquettes

II - ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES HUMAINES 30

A. des phospholipases sanguines

- in vitro
- au cours de la coagulation en présence de plaquettes de rat

B. des phospholipases tissulaires

III - ETUDE DU LYSAT DES PLAQUETTES SANGUINES DU RAT 34

A. mise en évidence de quelques propriétés

B. étude de l'activité phospholipasique

C. purification partielle par fractionnements

- sur colonne de Séphadex G 100
- sur colonne de Blue Sépharose CL 6B

IV - ETUDE DES PHOSPHOLIPASES PLASMATIQUE ET SERIQUE : MISE EN EVIDENCE DU MODE D'ACTION DE L'ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE 44.

A. isolement par précipitation par $(NH_4)_2SO_4$

B. purification

- sur colonnne de Séphadex G100
- sur colonne de Blue Sépharose CL 6B

a/ de la phospholipase plasmatique

b/ de la phospholipase sérique

c/ différence de localisation des deux formes de la phospholipase au cours du fractionnement par le sulfate d'ammonium

CONCLUSIONS ET DISCUSSION 57

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 62

BIBLIOGRAPHIE 64

RESUME

R E S U M É

Les plaquettes sanguines de rat renferment un facteur capable d'activer in vitro les phospholipases plasmatique et globulaire du rat. Cet activateur libéré par la lyse plaquettaire au cours de la coagulation transforme la phospholipase activable du plasma en phospholipase active, qui est dosée dans le sérum. La coagulation en absence des plaquettes, n'est pas accompagnée d'activati

L'activateur peut agir sur des phospholipases tissulaires du rat notamment celles de l'aorte et du poumon.

L'injection dans l'aorte d'un lysat de plaquettes partiellement purifié qui renferme l'activateur, provoque 10 min. plus tard, l'activation rapide, incom plète et temporaire (durée : 20 min. environ) des phospholipases sanguines alors que l'activation des phospholipases aortiques plus lente est totale.

L'activateur d'origine plaquettaire de rat agit également in vitro sur les phospholipases sanguines, artérielles et pulmonaires de l'homme.

L'étude du lysat de plaquettes préparé par congélations et décongélations successives, montre que l'activateur est de nature protéique, de poids moléculair élevé et thermolabile.

Le lysat de plaquettes possède une activité phospholipasique de type A_2 qui présente deux zones de pH optimum ; l'une comprise entre 6,7 et 7,5 (activité spécifique 500 à 600), l'autre plus faible, comprise entre 9 et 10 (activité spécifique 200 à 300).

La phospholipase nécessite la présence d'ions Ca^{2+} dans le milieu d'incubati (concentration finale optimale 10 mM), un excès n'est pas inhibiteur ; la vitesse de la réaction est constante pendant les quinze premières minutes. Il existe une concentration optimale du substrat ; des quantités supérieures à 25 nanomoles par 2 ml de volume final sont inhibitrices.

L'activité phospholipasique reste stable lorsque l'enzyme est chauffée 10 min. à 55°C ; elle diminue ensuite, elle est détruite en totalité à 100°C. L'activité phospholipasique est sensible à la présence de détergent à très faible concentration (desoxycholate de Na à 2 p1000, Triton X 100 à 1 p1000).

Les fractionnements successifs sur colonne de Séphadex G100 et sur colonne de Blue Sépharose CL 6B du lysat de plaquettes de rat permettent de dissocier les phospholipases active et activable de l'activateur.

La purification partielle de la phospholipase activable du plasma et de la phospholipase active du sérum permet de mettre en évidence le mode d'action de l'activateur plaquettaire.

Les phospholipases activable du plasma et active du sérum sont isolées par un fractionnement à l'aide de $(NH_4)_2SO_4$. La phospholipase plasmatique qui accompagne l'albumine, peut être débarrassée de celle-ci par un fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B. La phospholipase sérique précipite avec les globulines ; leur fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B, permet de dissocier la phospholipase active du sérum en deux protéines inactives

C'est l'association de deux protéines inactives qui fait apparaître une activité phospholipasique dans le sérum. Cette association qui se forme au cours de la coagulation, reproduite in vitro en mélangeant une phospholipase activable et l'activateur partiellement purifié, peut être également rompue par un fractionnement sur une colonne de Blue Sépharose CL 6B.

La localisation différente des deux formes de l'enzyme au cours du fractionnement par $(NH_4)_2SO_4$, est liée à la présence de l'activateur libéré au cours de la coagulation par la lyse plaquettaire.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'existence d'enzymes dégradant les phospholipides avec libération d'acides gras a été observée initialement dans le suc pancréatique (76). Ultérieurement elles ont été trouvées dans tous les venins d'abeilles et de scorpions (47). Ces enzymes attaquent les liaisons esters du glycérol (69) en donnant les lysodérivés et on désigna par phospholipases A_1 et A_2 les enzymes produisant respectivement les 2-acyl et 1-acyllysophospholipides.

Les phospholipases des venins et du pancréas sont de type A_2 (73), que renferment la plupart des tissus des mammifères (36). Leur action a été particulièrement étudiée sur la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, mais elles peuvent également hydrolyser la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol le phosphatidylglycérol ou l'acide phosphatidique (6).

L'activité phospholipasique A_2 a également été étudiée dans le sang, particulièrement dans les globules rouges de l'homme (9, 59), du rat (57), du mouton (44, 48), dans le sérum de l'homme (11, 25, 46) et de différents animaux (11) le plasma de souris (38), les leucocytes humains (35) et du lapin (23, 34).

Depuis quelques années, l'intérêt des physiologistes s'est porté sur l'étude de l'activité des phospholipases membranaires (71) et intracellulaires (72) de la plupart des organes : foie (14, 54), poumon (53, 55), intestins (8, 56), pancréas (3,15,19, 20, 21, 32, 70), plasma séminal (49), rate (62), peau (78), thyroïde (17), reins (2), utérus (39) de différents mammifères.

Certaines phospholipases A_2 ont été purifiées (71) notamment celles de la rate du rat (62), des leucocytes de lapin (23) des érythrocytes de mouton (48), des plaquettes d'homme (43) et du lapin (45).

On sait maintenant que les phospholipides subissent un cycle de désacylation et de réacylation au cours des multiples activités membranaires. Cette hydrolyse des phospholipides membranaires ne doit pouvoir être déclenchée que sous l'influ- d'effecteurs physiologiques appropriés, il est donc particulièrement intéressant d'étudier ce mécanisme d'activation des phospholipases membranaires.

Le rôle des phospholipases A_2 plaquettaires est particulièrement important. Différents auteurs étudient celles-ci, soit sur le lysat total, soit après fractionnement subcellulaire, principalement chez l'homme (1, 16, 65, 68), le lapin (45), le cheval (5).

Ils observent également leur action sur des substrats spécifiques en fonction de stimulations externes : thrombine, ionophore 23 187, collagène, etc...

Nous nous limitons, dans ce travail, à l'étude de la phospholipase A_2, mais il est possible d'imaginer d'autres processus pour expliquer les cycles de désacylation, réacylation des phospholipides. En particulier le phosphatidylinositol est dégradable par une phospholipase spécifique en un diglycéride qui peut subir l'action d'une lipase ; cette voie a été découverte par CHAP et coll. (12) dans le fonctionnement de la stimulation plaquettaire par la thrombine. Secondairement dans ces mêmes cellules, il se produit une activation de phospholipases A_2 dont certaines peuvent agir spécifiquement sur les acides phosphatidiques (6, 50) et d'autres (peut-être les mêmes ?) sur les phosphatidylcholines qui sont une source abondante d'acide arachidonique libre dans les plaquettes (60). Le mécanisme d'activation de ces phospholipases A_2 met en jeu les ions calcium et la calmoduline (77). Plus récemment, il a été observé qu'une phospholipase A_2 était inhibée par une protéine de poids moléculaire 40.000, appelée lipomoduline (42) qui peut subir un cycle de phosphorylation sous l'effet de stimulations membranaires.

Ce que l'on sait de la localisation intracellulaire des phospholipases A_2 qui a été étudiée dans les plaquettes d'homme (68), de lapin (45) et de cheval (5) est encore trop général pour qu'on puisse savoir quels sont leurs rôles respectifs et leurs modes de régulations.

Un autre type d'activation des phospholipases A_2 nous est fourni par la transformation du zymogène pancréatique en phospholipase A_2 active dans l'intestin. Il s'agit alors d'une hydrolyse par une protéase de spécificité trypsine (15).

Préalablement à ce travail, il avait été observé que chez le rat, le sérum (2) possédait une phospholipase A_2 active, alors que le plasma (58) en était dépourvu mais que traité par une solution de trypsine, il acquérait une activité phospholipasique importante, sans toutefois égaler celle du sérum.

Ultérieurement, nous avons constaté que le plasma riche en plaquettes, possédait également une phospholipase active importante, égale à celle d'un plasm activé par la trypsine brute (58). En collaboration avec Duchesne M.J. (18), nous avons mis en évidence, dans le lysat de plaquettes sanguines de rat, un facteur d nature protéinique capable d'activer, in vitro, des phospholipases plasmatiques, globulaires ou tissulaires.

Notre travail fait apparaître que cette activation se produit au cours de la coagulation, grâce au facteur activateur libéré par la lyse des plaquettes et se traduit par la présence d'une phospholipase active dans le sérum et le lysat du caillot ; nous avons également montré qu'en fonction du temps de contact sérum-caillot, l'activité phospholipasique du sérum augmentait aux dépens de cell du caillot (26). Nos travaux plus récents ont abouti à mettre en évidence que l'activité phospholipasique est due à l'association de deux protéines inactives (30), l'une d'origine plaquettaire et l'autre d'origine plasmatique, globulaire ou tissulaire.

L'étude de l'activité phospholipasique du lysat plaquettaire a montré qu'à côté d'une activité phospholipasique A_2 proprement dite, nous dosons une phospholipase qui, comme dans le cas du sérum, résulte de l'association de deux protéines. Les plaquettes contiennent donc, comme les autres tissus, une protéine activable par le "facteur protéinique activateur" qu'elles renferment.

Nous avons également constaté que ce facteur activateur peut agir in vitro sur la phospholipase des membranes plasmiques du foie (67), des artères (27) et du poumon de l'homme, du rat (53) et sur les phospholipases sanguines humaines (9

ABREVIATIONS

ABRÉVIATIONS

PRP plasma riche en plaquettes
PDP plasma dépourvu de plaquettes
plq plaquettes
Ab albumine
PE phosphatidyléthanolamine
LPE lysophosphatidyléthanolamine

Les résultats sont exprimés

Pour la phospholipase sanguine

- En nanomoles de LPE formées en 60 min. d'incubation à 37°C par 1 ml de plasma ou de lysat de globules rouges, de sérum ou de lysat de caillot.

Pour la phospholipase tissulaire

- En nanomoles de LPE formées en 60 min. d'incubation à 37°C pour une prise aliquote d'homogénat correspondant à 40 mg. de tissus frais équivalents à 1 mg. de protéines solubles.

L'activité spécifique est exprimée

. pour la phospholipase par le nombre de nanomoles de LPE formées en 60 min. par 1 mg. de protéines.

. pour l'activateur par le nombre de nanomoles de LPE formées en 60 min. par 1 mg. de protéines agissant in vitro sur une quantité déterminée de phospholipase dans les conditions optimales.

L'activité totale est exprimée par le nombre de nanomoles de LPE libérées en 60 min. par la totalité des protéines de l'échantillon considéré.

Phospholipase active : dosée directement.

Phospholipase activée : dosée après addition de lysat plaquettaire dans le milieu réactionnel.

TECHNIQUES GENERALES

TECHNIQUES GÉNÉRALES

Nous utilisons des rats mâles ou femelles de race Sprague-Dawley pesant de 250 à 300 g.

I - PRELEVEMENTS

A/ du sang

Après anesthésie de l'animal par l'éther, le sang est prélevé à l'aide d'une seringue de 10 ml dans la fourche aortique ; le sang peut être recueilli soit :

- en tubes siliconés contenant 2 ml d'une solution anticoagulante d'acide citrique-dextrose (A.C.D. : 5.5 g. d'acide citrique, 2.1 g. de soude, 10 g. de glucose dissous dans 150 ml d'eau distillée) pour obtenir le plasma riche en plaquettes (PRP) à partir duquel seront séparées les plaquettes utilisées pour la préparation du lysat et le plasma dépourvu de plaquettes (PDP) conservé en vue de l'isolement de la phospholipase activable.

- en tubes non siliconés et sans anticoagulant, pour obtenir le sérum utilisé pour étudier la phospholipase active.

a. préparation du lysat de plaquettes (18)

Le PRP est séparé des globules rouges par une centrifugation de 10 min. à 300 g. Ce PRP, soumis à une centrifugation de 6000 g pendant 30 min., permet d'isoler le culot plaquettaire qui est lavé 2 à 3 fois par une solution de liquide de Piette (2,43 g de diéthylamino-2 éthyl p-amino benzoate chlorhydrate et 0,2 g de NaCl dissous dans 100 ml d'eau distillée) afin d'éliminer les leucocytes et les globules rouges contaminants. Le culot plaquettaire est alors mis en suspension dans une solution de sérum physiologique.

Cette suspension peut être soit :

- entièrement solubilisée par addition d'un détergent, le sodium dodécylsulfate (SDS), à 0,25 p.1000 de concentration finale, ou de desoxycholate de sodium (DOC), à une concentration finale de 1 p.1000 ; 1 ml de ces solutions plaquettaires, correspondant à 1 ml de PRP initial, renferme 1,5 à 2 mg. de protéines.

- soumise à une série de congélations et de décongélations successives, les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation de 10 min à 27000 g. Le surnageant constitue le lysat plaquettaire ; 1 ml de ce lysat, correspondant à 1 ml de PRP traité, contient 0,8 à 1 mg. de protéines.

b. préparation du lysat de globules rouges (57)

Les globules rouges séparés du PRP sont lavés plusieurs fois par une solution de sérum physiologique, afin d'éliminer les plaquettes contaminantes et lysés par l'eau distillée (4 volumes d'eau pour 1 volume de globules rouges). Le lysat est stabilisé par addition de NaCl à concentration finale 1 M. Les stromas sont éliminés par une centrifugation de 10 min. à 15000 g.

Le volume final du lysat est amené à 10 fois celui des globules rouges traité Le lysat de caillot est préparé dans les mêmes conditions que celles de globules rouges ; le caillot est préalablement broyé dans les 4 volumes d'eau distillée.

B/ des organes (artères et poumons)

Après l'exsanguination de l'animal, 50 ml d'une solution de sérum physiologique sont injectés très lentement dans le système circulatoire de manière à élimine au maximum le sang résiduel dans les différents organes. L'aorte, débarrassée des tissus adventifs, et les lobes du poumon, parfaitement lavés, sont prélevés.

préparation des homogénats tissulaires (27)

Les artères et les poumons sont soigneusement lavés par une solution de sérum physiologique, puis séchés et pesés ; finement découpés, ils sont homogénéisés à l'aide d'un appareil de Potter, dans une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2)-NaCl 0.5 M. Après centrifugation des homogénats 10 min. à 22000 g, seuls les surnageants sont conservés.

1 ml de surnageant d'homogénat d'artères, correspondant à 20 mg. de tissus frais, renferme 0,7 à 1 mg. de protéines.

1 ml de surnageant d'homogénat de poumons, correspondant à 100 mg. de tissus frais, contient 0,4 à 0,5 mg. de protéines.

II - METHODES DE DOSAGE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE

L'activité phospholipasique est dosée en mesurant la quantité de lysophosphatidyléthanolamine (LPE) et d'acides gras, formée au cours de l'incubation de l'enzyme en présence de son substrat : la phosphatidyléthanolamine (PE) marquée au ^{14}C.

A préparation et purification de la phosphatidyléthanolamine marquée au ^{14}C (24)

Le substrat est préparé à partir d'une souche d'Escherichia Coli K12 3000, Institut Pasteur, Paris) ensemencée en milieu Tryptose T5 (500 mg. de Tryptose et 250 mg. de NaCl dissous dans 50 ml d'eau distillée), dans lequel ont été introduits au préalable 5 ml d'acétate de sodium marqué au ^{14}C.

Les cellules sont isolées par une centrifugation de 15 min. à 32000 g, puis broyées dans le mélange chloroforme/méthanol 1-2 (v/v).

Les phospholipides extraits sont lavés suivant la technique mise au point par Folch-Pi et coll (33), dans le but d'éliminer l'acétate marqué contaminant.

La PE marquée au ^{14}C est isolée et purifiée par chromatographie sur colonne d'Unisil (200-325 Mesh) (Clarkson Chemical Company) éluée par des mélanges chloroforme/méthanol, progressivement enrichis en méthanol.

La pureté de chaque fraction est testée par autoradiographie (films Kodak, Kodirex 18x24) après chromatographie en couche mince sur plaque de Silicagel (G 1500 Schleicher et Schull, 20 x 21) en phase neutre (chloroforme/méthanol/eau, 65/25/4, v/v) pendant 1 heure.

Pour doser l'activité phospholipasique, nous préparons à partir de cette PE marquée au ^{14}C, une émulsion dans une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2), soniquée 2 min. à 150 watts, dans des conditions telles que 0,1 ml de cette émulsion renferme 16 nanomoles de PE correspondant à 60.000 dpm.

B/ conditions d'incubation

16 nanomoles de PE marquée au ^{14}C, sont incubées en présence de prises aliquotes de phospholipases active ou activable correspondant à une quantité de protéines de 20 ug à 2 mg., suivant le matériel étudié. Les phospholipases activables sont dosées après activation par l'activateur plaquettaire.

Le volume final en milieu tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2), est de 2 ml en présence de $CaCl_2$ à une concentration finale de 10 mM, les temps d'incubation variant entre 15 et 60 min. suivant le matériel. La réaction enzymatique est arrêtée par addition du mélange chloroforme/méthanol 1/2 (v/v).

Le mélange composé de phosphatidyléthanolamine non hydrolysée, de lysophosphatidyléthanolamine et d'acides gras formés au cours de la réaction, sont séparés par chromatographie en couche mince sur plaque de Silicagel (G 1500 Schleicher et Schull, 20 x 21) en phase solvante neutre (chloroforme/méthanol/eau, 100/40/6, v/v) en 60 min. de migration.

Les différentes taches sont repérées par autoradiographie des plaques à l'aide de films (Kodak, Kodirex 18x24). L'acide silicique, correspondant à chaque tache, est recueilli en fiole de comptage contenant 3 ml du liquide de scintillation (5 g PPO, 0,3 g de POPOP pour un litre de toluène), la radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Le pourcentage de PE hydrolysée en LPE et en acides gras au cours de l'incubation, permet de déterminer l'activité phospholipasique de l'échantillon testé.

Les résultats sont exprimés en nanomoles de LPE formées en 60 min. d'incubation par 1 mg. de protéines.

III - PURIFICATION PAR FRACTIONNEMENT SUR COLONNE

Pour ce type de purification, nous utilisons principalement deux types de support : Séphadex G 100 et Blue Sépharose CL 6B (Pharmacia).

Le choix du support, ainsi que celui du type de colonne utilisé, est détermin par la nature et la quantité de protéines à purifier.

Quel que soit le fractionnement utilisé, les éluats des différentes fractions après avoir été réunis, sont concentrés à l'aide de cellules d'ultrafiltration DIAFLO (Amicon).

Après concentration, les protéines de chaque fraction sont dosées par la technique de Lowry (51), en utilisant la sérumalbumine bovine (Sigma) comme protéi de référence, ainsi que leur activité phospholipasique.

RESULTATS

RÉSULTATS

I - ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES SANGUINES ET TISSULAIRES DU RAT PAR L'ACTIVATEUR D'ORIGINE PLAQUETTAIRE

A/ des phospholipases sanguines

a. in vitro

En collaboration avec Duchesne (18), nous avons précédemment montré que chez le rat :

- le plasma riche en plaquettes (PRP) contient une phospholipase active, capable d'hydrolyser la PE exogène en LPE et en acide gras.

- le plasma dépourvu de plaquettes (PDP) ne possède qu'une faible activité phospholipasique ; l'addition in vitro d'un lysat plaquettaire fait apparaître une activité comparable à celle d'un PRP (tableau I).

Il en est de même pour le lysat de globules rouges, préparé à partir de globules rouges débarrassés des plaquettes contaminantes ; peu actif, il le devient quand il est traité in vitro par un lysat de plaquettes (tableau I).

Le lysat de plaquettes sanguines de rat renferme donc un facteur capable de faire apparaître une activité phospholipasique supplémentaire dans un plasma ou un lysat de globules rouges.

b. au cours de la coagulation

Nous avons constaté que le facteur plaquettaire agit également sur les phospholipases sanguines au cours de la coagulation : le plasma et le lysat de globules rouges sont peu actifs, le sérum et le lysat du caillot possèdent une activité phospholipasique importante (figure 1).

Cette figure 1 montre que le sérum possède une activité phospholipasique supérieure à celle du plasma.

T A B L E A U I

	PHOSPHOLIPASES		
	ACTIVE	ACTIVEE	TOTALE
P R P	6.400	0	6.400
P D P	200	6.000	6.200
Lysat de globules rouges	120	13.350	13.470

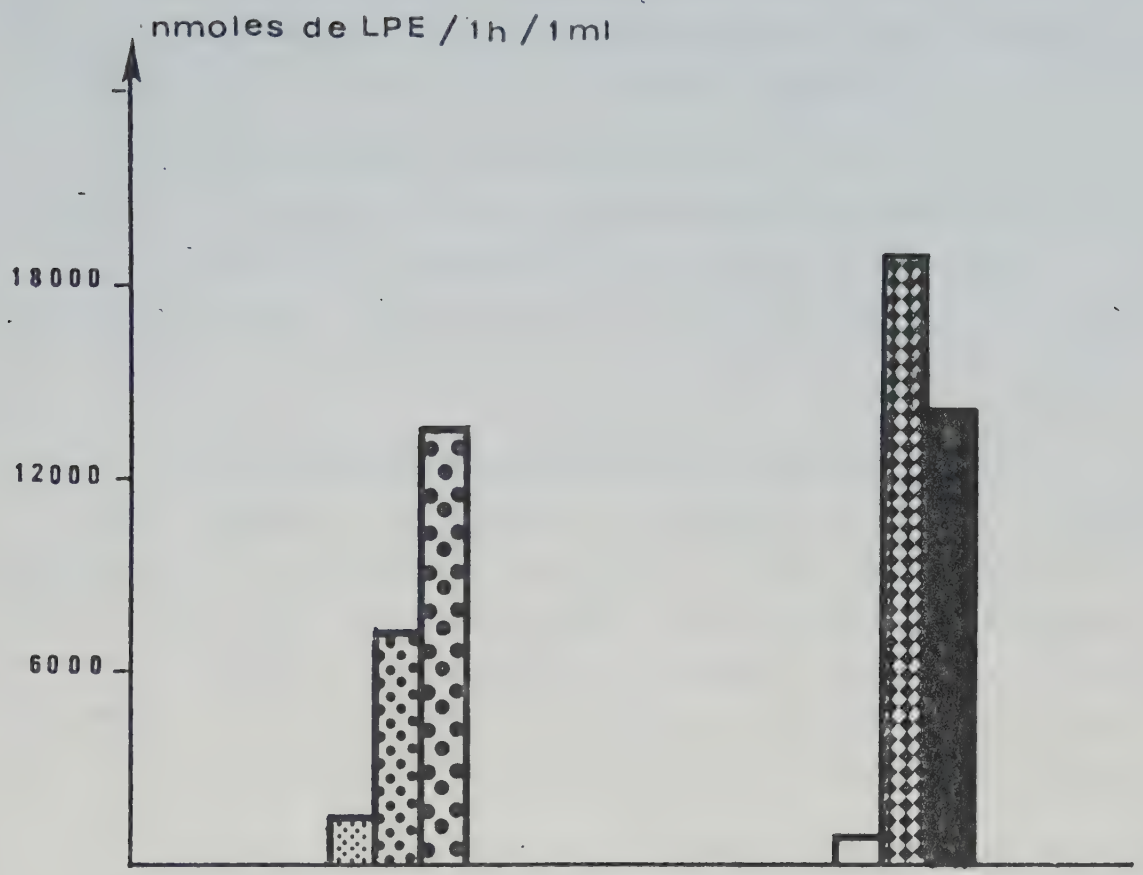
Comparaison de l'activité phospholipasique du PRP, du PDP et du lysat de globules rouges traités ou non par un lysat de plaquettes sanguines de rat

Ces résultats sont exprimés en nanomoles de LPE formées en 60 min. d'incubation à 37°C par 1 ml de plasma ou de lysat de globules rouges.

Conditions d'incubation

16 nanomoles de phosphatidyléthanolamine marquée au ^{14}C sont incubées 15 min à 37°C avec agitation avec 1 ml de plasma ou de lysat de globules rouges traité ou non par 0,5 ou 1 µg. de protéines plaquettaires en milieu tampon tris-HCL 0,05 (pH 7,2) en présence de $CaCl_2$ à concentration finale 10 mM dans un volume total de 2 ml.

FIGURE 1



COMPARAISON DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE D'UN :

- Plasma
- Plasma activé par le facteur plaquettaire
- Sérum activé ou non
- Lysat de globules rouges
- Lysat de caillot activé ou non
- Lysat de globules rouges activé par le facteur plaquettaire

Les résultats sont exprimés en nanomoles de LPE formé en 1 h d'incubation à 37°C par : 1 ml de plasma ou de sérum
1 ml de lysat correspondant à 0,1 ml de globules rouges ou de caillot traité.

Les conditions d'incubation sont celles décrites sous le tableau I.

En dosant l'activité phospholipasique du sérum à des temps variables de séparation du caillot après le prélèvement du sang, nous avons constaté que son activité augmentait en fonction du temps de contact caillot-sérum et que parallèlement, celle du lysat du caillot diminuait (figure 2).

Cette courbe montre la double origine de la phospholipase sérique :
- l'une due à l'activation de la phospholipase plasmatique par un facteur libéré au cours de la coagulation par la lyse de plaquettes,
- l'autre due à son enrichissement en phospholipase active globulaire.

Rôle des plaquettes au cours de la coagulation

Ayant constaté qu'au cours de la coagulation il se produit une activation des phospholipases sanguines, nous avons étudié le rôle des plaquettes dans cette activation ; pour celà, nous avons comparé l'activité phospholipasique des sérums et des caillots obtenus : par coagulation spontanée (sérum I) et par recalcification d'un sang total recueilli sur anticoagulant (sérum II) et d'un mélange plasma et globules rouges débarrassés de leurs plaquettes contaminantes (sérum III) (tableau I

Les résultats obtenus mettent en évidence le rôle des plaquettes au cours de la coagulation : dans le cas de coagulation ou de recalcification d'un sang total, nous notons que la phospholipase est totalement activée, l'addition in vitro de lysat plaquettaire ne faisant pas apparaître d'activité supplémentaire ; par contre, dans le cas de coagulation obtenue après élimination des plaquettes, nous ne dosons qu'un faible activité phospholipasique comparable à celle du plasma. Ce sérum, traité in vitro par un lysat plaquettaire, acquiert l'activité d'un PRP.

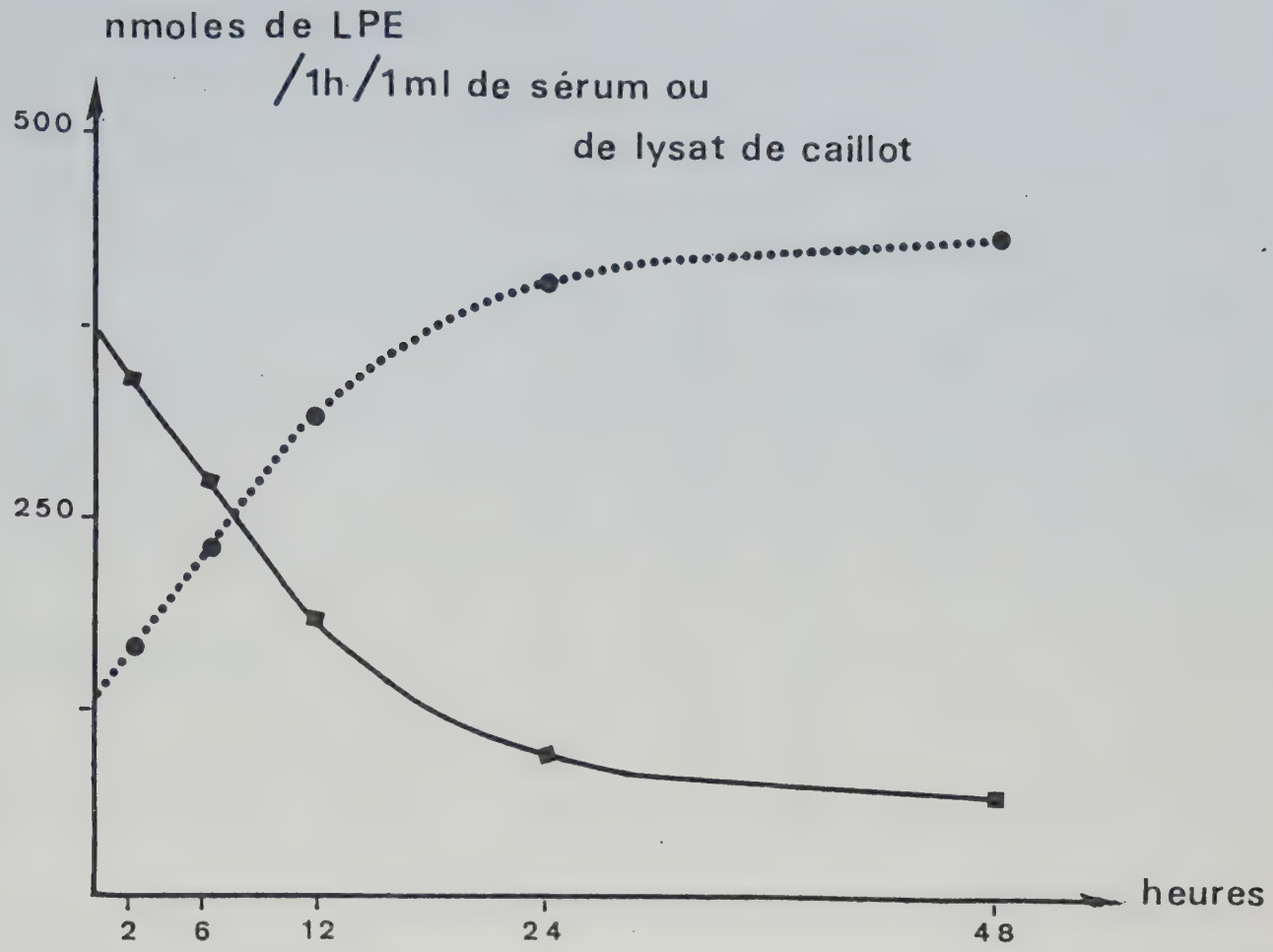
Au cours de la coagulation, les phospholipases plasmatiques ou globulaires sont activées par un facteur présent dans les plaquettes ; en leur absence, il n'y a pas d'activation.

Rôle de la lyse plaquettaire

Pour déterminer si la lyse des plaquettes est indispensable pour que l'activateur puisse agir, nous avons comparé l'activité phospholipasique

- d'un plasma témoin dépourvu de plaquettes (PDP I),

FIGURE 2



ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DU SERUM ET DU LYSAT DE CAILLOT DOSEE POUR DES TEMPS DE CONTACT CROISSANTS A PARTIR DU PRELEVEMENT DU SANG

Sérum

Lysat de caillot

Les conditions d'incubation sont celles décrites sous le Tableau I.

T A B L E A U II

		PHOSPHOLIPASES		
		ACTIVE	ACTIVEE	TOTALE
Sérums	I	12.500	1.500	14.000
	II	12.000	1.200	13.200
	III	300	6.300	6.600
Lysats de caillots	I	17.800	200	18.000
	II	18.000	200	18.200
	III	200	13.800	14.000

Comparaison de l'activité phospholipasique de sérums et de lysats de caillot obtenus après coagulation

Sérum I, Lysat de caillot I : d'un sang recueilli sans anticoagulant

Sérum II, Lysat de caillot II : par recalcification d'un sang total recueilli sur anticoagulant

Sérum III, Lysat de caillot III : par recalcification d'un mélange de plasma et de globules rouges débarrassés de leurs plaquettes

Conditions d'incubation

Elles sont identiques à celles décrites sous le tableau I.

- d'un plasma obtenu à partir d'un PRP laissé 24 heures à la température du laboratoire dans des conditions telles que l'intégrité des plaquettes soit respectée, puis déplaquetté (PDP II),

- d'un sérum obtenu par recalcification d'un plasma riche en plaquettes (sérum IV) (Tableau III).

Ce tableau (III) montre que le PDP II possède une activité phospholipasique comparable à celle d'un PDP témoin I, mais qu'il peut acquérir l'activité d'un PRP par addition d'un lysat plaquettaire. Le sérum IV ayant une phospholipase active, l'addition in vitro d'un lysat plaquettaire ne démasque pas d'activité supplémentaire. Le $CaCl_2$ en provoquant la lyse des plaquettes a libéré une quantit de facteur activateur telle que toute la phospholipase plasmatique est activée.

c. <u>après injection</u>

Cet activateur, d'origine plaquettaire, peut également agir sur les phospholipases sanguines lorsqu'il est injecté à l'animal.

Pour ce type d'expérimentation, nous utilisons un lysat de plaquettes partiellement purifié par fractionnement à l'aide d'une colonne de Séphadex G100 (chapitre III page 41).

Nous injectons dans les mêmes conditions à des animaux anesthésiés au phénobarbutal, soit :

- 1 ml d'une solution de sérum physiologique pour les rats témoins ;

- 1 ml de lysat contenant 0.7 ou 1.5 mg de protéines plaquettaires partiellement purifiées pour les rats traités.

Injections et prélèvements sont effectués à la fourche aortique grâce à un système mis en place permettant l'obstruction du cathétère entre l'injection et le prélèvements, aux différents temps considérés, 2, 5, 10 et 15 min. après l'injection.

Pour chaque type d'injection, l'activité phospholipasique des différents plasmas (figure 3) et lysats de globules rouges (figure 4) est dosée avant et après action in vitro du lysat de plaquettes.

T A B L E A U III

	PHOSPHOLIPASES		
	ACTIVE	ACTIVEE	TOTALE
P R P	6.400	0	6.400
P D P I	300	6.000	6.300
P D P II	450	5.750	6.200
Sérum IV	7.200	0	7.200

Rôle de la lyse plaquettaire dans l'activation de la phospholipase plasmatique au cours de la coagulation

PDP I — plasma témoin

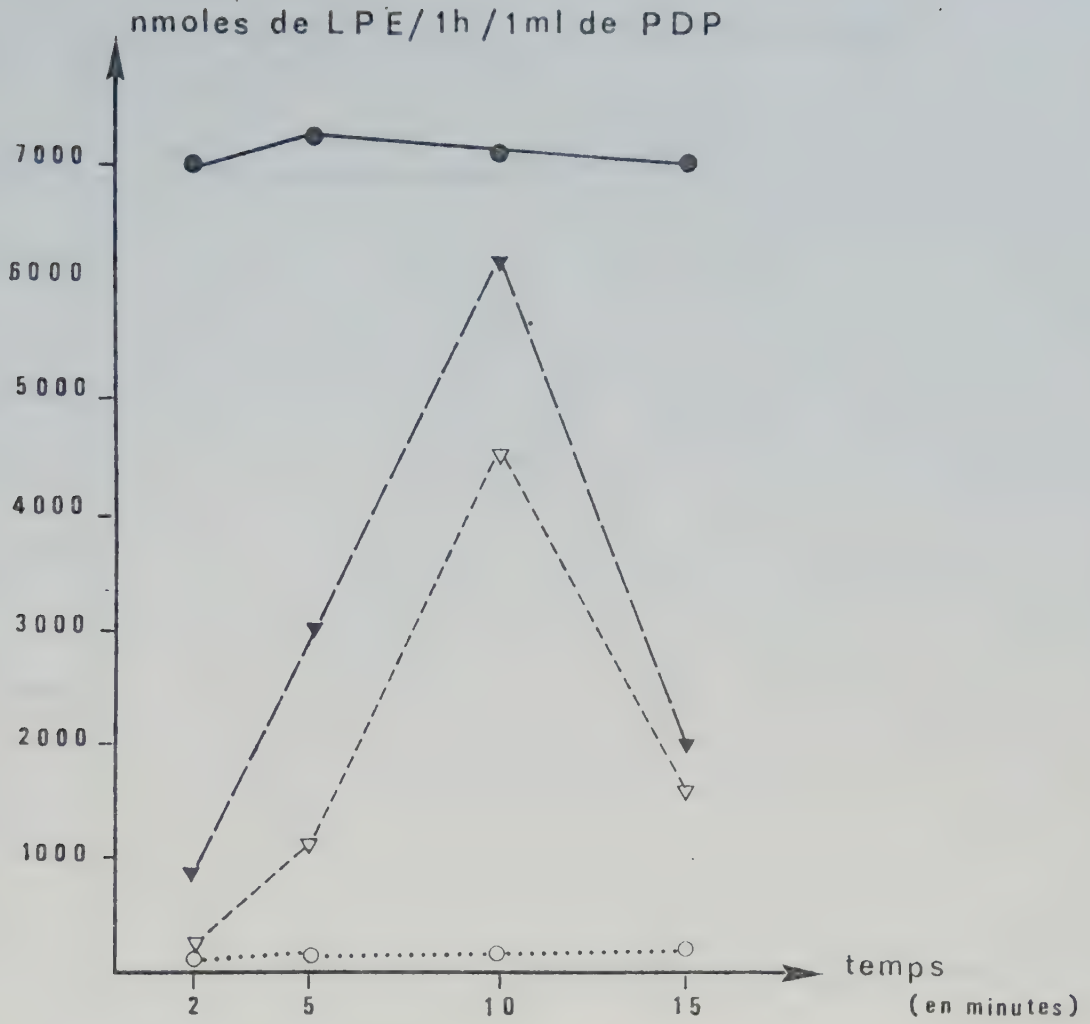
PDP II — plasma obtenu à partir d'un PRP laissé 24 heures à température ambiante puis déplaquetté

Sérum IV — PRP recalcifié

Conditions d'incubation

Elles sont identiques à celles décrites sous le tableau I

FIGURE 3



ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES PLASMATIQUES APRES INJECTION DU LYSAT PLAQUETTAIRE PARTIELLEMENT PURIFIE

Activité phospholipasique du plasma du rat :

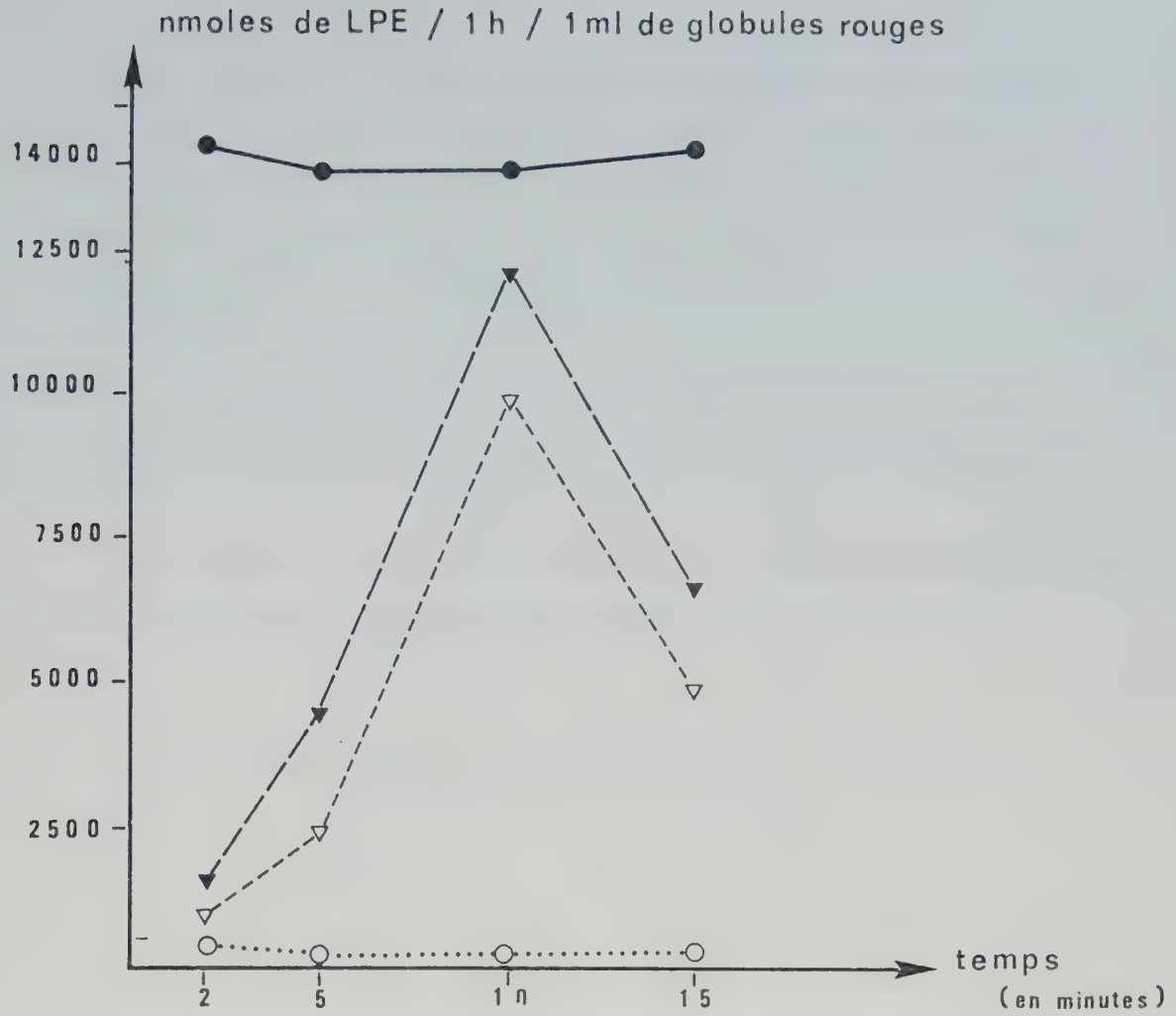
..○....○.. témoin ayant reçu une injection d'1 ml de solution de sérum physiologique :-sans activation

—●—●— " " :-après activation in vitro par le lysat de plaquettes

—▽- - -▽— traité ayant reçu une injection contenant 0,7 mg. de protéines plaquettaires

—▼——▼— traité ayant reçu une injection contenant 1,5 mg. de protéines plaquettaires

FIGURE 4



ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES GLOBULAIRES APRES INJECTION DU LYSAT PLAQUETTAIRE PARTIELLEMENT PURIFIE

Activité phospholipasique du lysat de globules rouges du rat :

témoin ayant reçu une injection d'1 ml de solution de sérum physiologique : -sans activation

" " : -après activation in vitro par le lysat de plaquettes

traité ayant reçu une injection contenant 0,7 mg. de protéines plaquettaires

traité ayant reçu une injection contenant 1,5 mg. de protéines plaquettaires

Les courbes 3 et 4 montrent que les phospholipases sanguines du rat témoin n'ont subi aucune modification et se comportent comme celles de rats n'ayant pas reçu d'injection. Ches les rats traités, nous notons une activation sensible des phospholipases plasmatique et globulaire dès les premières minutes suivant l'injection, activation qui augmente rapidement pour atteindre un optimum 10 min. après l'injection et décroître immédiatement ; une dose plus faible de protéines activatrices provoque une activation légèrement moins forte ; dans aucun cas nous n'obtenons une activation totale des phospholipases sanguines : l'addition in vit d'un lysat plaquettaire fait apparaître une activité supplémentaire.

Par injection du facteur plaquettaire, nous obtenons une activation rapide mais incomplète et temporaire des phospholipases sanguines.

B/ des phospholipases tissulaires

a. in vitro

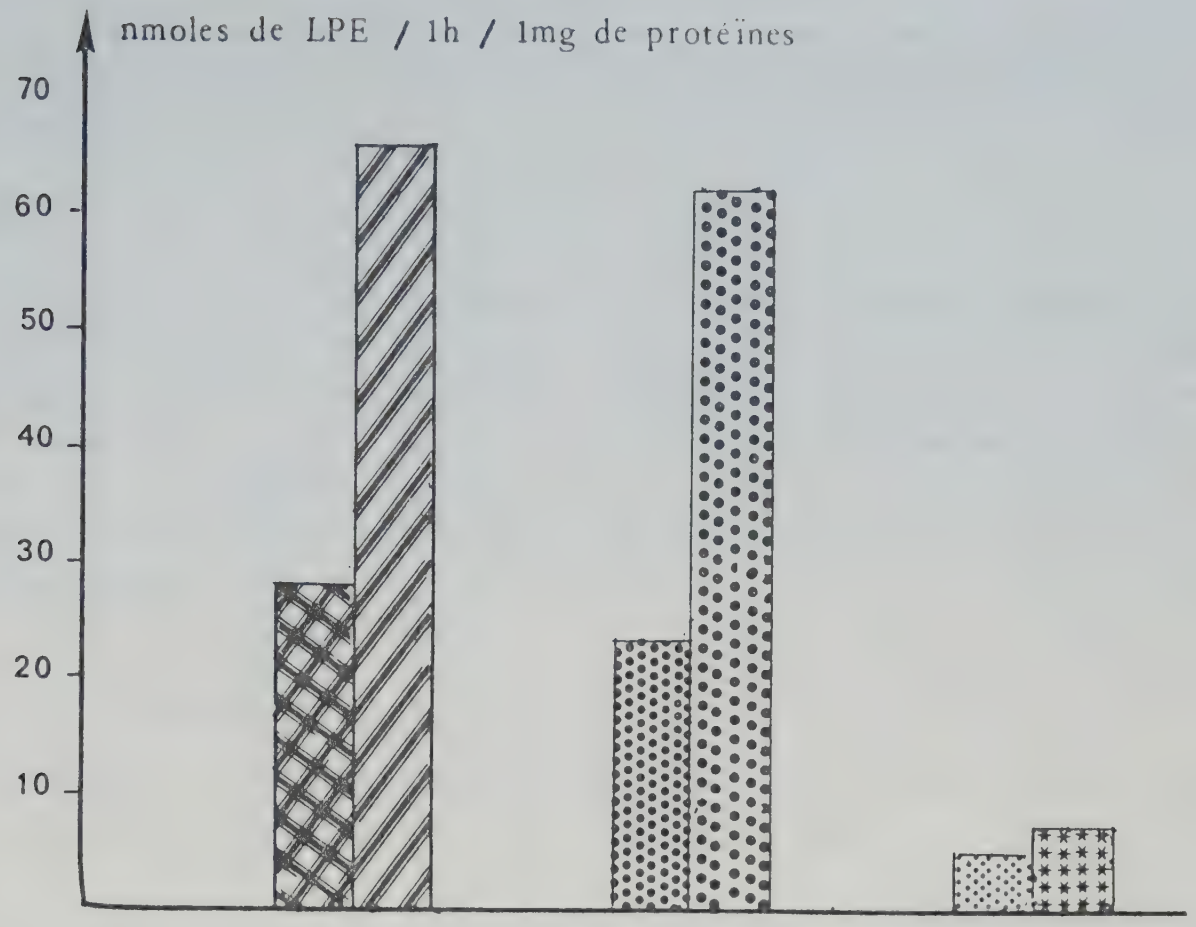
Le facteur plaquettaire peut également activer des phospholipases d'origine tissulaire : artères (27), poumons (53), foie (14, 67).

Aorte

Les homogénats sont préparés dans une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7 contenant NaCl à une concentration de 0,5 M ; la présence de NaCl est indispensab pour solubiliser les phospholipases tissulaires ; pour mettre en évidence son rôl nous avons comparé des phospholipases active et activable d'un homogénat total et de la fraction soluble de cet homogénat avant et après dialyse (figure 5).

La figure 5 met en évidence que l'activité phospholipasique de la fraction soluble de l'homogénat préparé en présence de NaCl et non dialysée est comparable à celle de l'homogénat total. La concentration en NaCl doit être égale ou supérie à 0,5 M ; à une concentration inférieure, la solubilisation de l'enzyme n'est pas totale. Le NaCl présent dans le milieu active partiellement la phospholipase, mais il ne peut se substituer au lysat plaquettaire, celui-ci faisant toujours apparaître une activité phospholipasique supplémentaire. L'élimination de NaCl d'un homogénat total par dialyse s'accompagne de la disparition d'activité phospholipasique dans sa fraction soluble, tandis que l'homogénat total conserve son activité.

FIGURE 5



COMPARAISON DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE D'UN HOMOGENAT D'AORTE ET DE SA FRACTIO SOLUBLE AVANT ET APRES DIALYSE TRAITES OU NON PAR L'ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE

- Activité phospholipasique d'un homogénat total
- Activité phospholipasique d'un homogénat total traité par le lysat de pla que
- Activité phospholipasique de la fraction soluble d'homogénat
- Activité phospholipasique de la fraction soluble d'homogénat traitée par le lysat plaquettaire
- Activité phospholipasique de la fraction soluble d'homogénat obtenue après dialyse
- Activité phospholipasique de la fraction soluble d'homogénat obtenue après dialyse traitée par le lysat plaquettaire

Conditions d'incubation :

16 nanomoles de PE marquée au ^{14}C

2,5 mg. ou 5 mg. de protéines d'homogénat total ou 0,2 à 0,5 mg. de protéines solubles traités ou non par 10 µg de protéines du lysat plaquettaire en milieu tampon tris 0.05 M pH 7,2 en présence ce $CaCl_2$ à une concentration finale 5.10^{-3} dans un volume total de 2 ml.

Les phospholipases de l'aorte sont solubilisées par le NaCl mais cette solubilisation est réversible : l'élimination du sel par dialyse provoquant leur refixation sur les membranes.

Poumons

Nous avons constaté que la présence de NaCl dans l'homogénat de poumons joue le même rôle que dans le cas de l'aorte : il permet la solubilisation de l'enzyme, son élimination par dialyse provoque la refixation des phospholipases sur les membranes comme dans le tissu artériel. L'activité phospholipasique de la fraction soluble d'un homogénat de poumon est dosée en absence et en présence de lysat plaquettaire : la figure 6 montre que le facteur activateur fait apparaître une activité supplémentaire.

b. après injection

Comme pour les phospholipases sanguines, l'activateur plaquettaire peut agir sur les phospholipases de l'aorte après injection à l'animal.

La technique d'injection à la fourche aortique d'un lysat plaquettaire partiellement purifié est identique à celle utilisée pour l'étude des phospholipases sanguines (chapitre I page 21).

Les rats traités reçoivent une injection de 1 ml d'extrait contenant 1,5 mg. de protéines du lysat partiellement purifié.

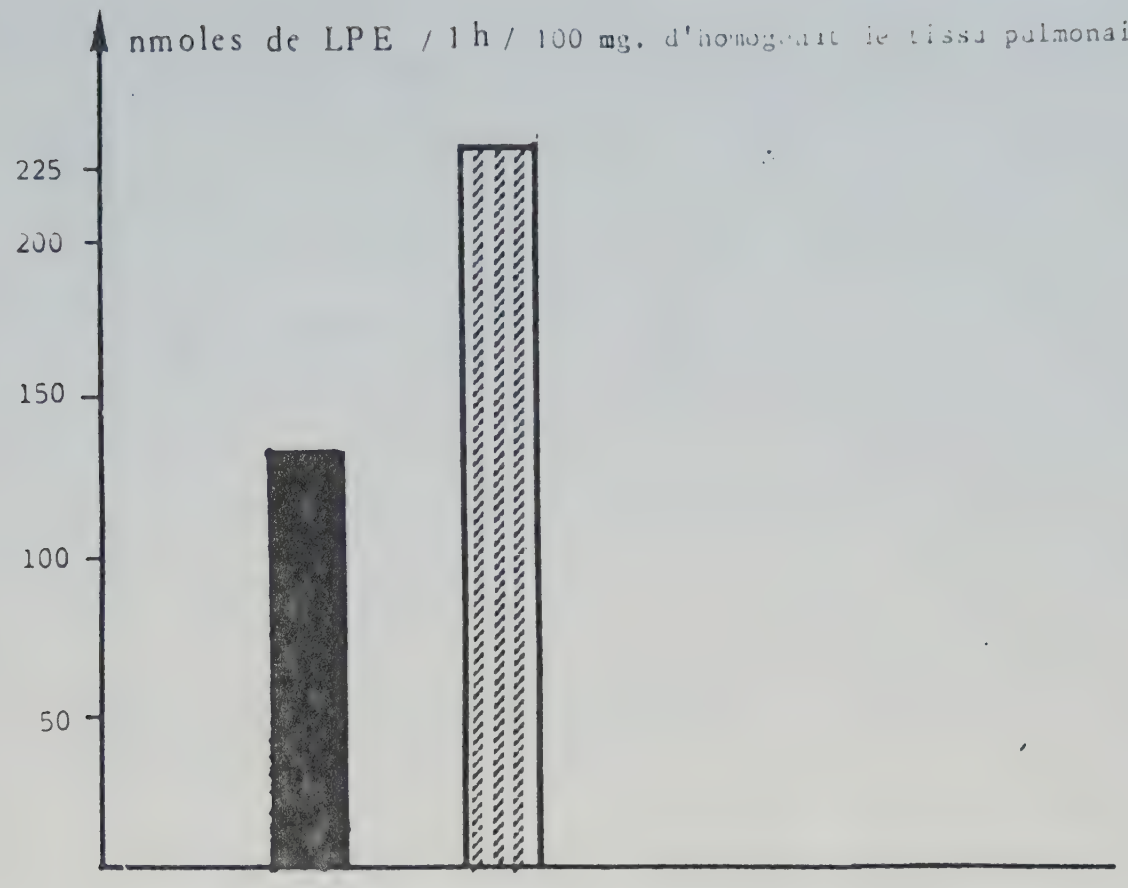
Les animaux sont sacrifiés pour chaque temps étudié (2, 5, 10, 15 min.).

Les artères sont prélevées et homogénéisées pour chaque temps considéré. L'activité phospholipasique de la fraction soluble de l'homogénat est dosée avant et après action in vitro du lysat plaquettaire (figure 7).

La courbe 7 montre que les phospholipases de l'aorte des rats témoins n'ont subi aucune modification alors que chez les rats traités un début d'activation apparaît 5 min. après l'injection et se poursuit progressivement pour être totale après 15 min., l'addition in vitro d'un lysat plaquettaire ne faisant pas apparaître d'activité supplémentaire.

Le facteur plaquettaire de rat injecté provoque donc une activation lente mais totale des phospholipases de l'aorte.

F I G U R E 6



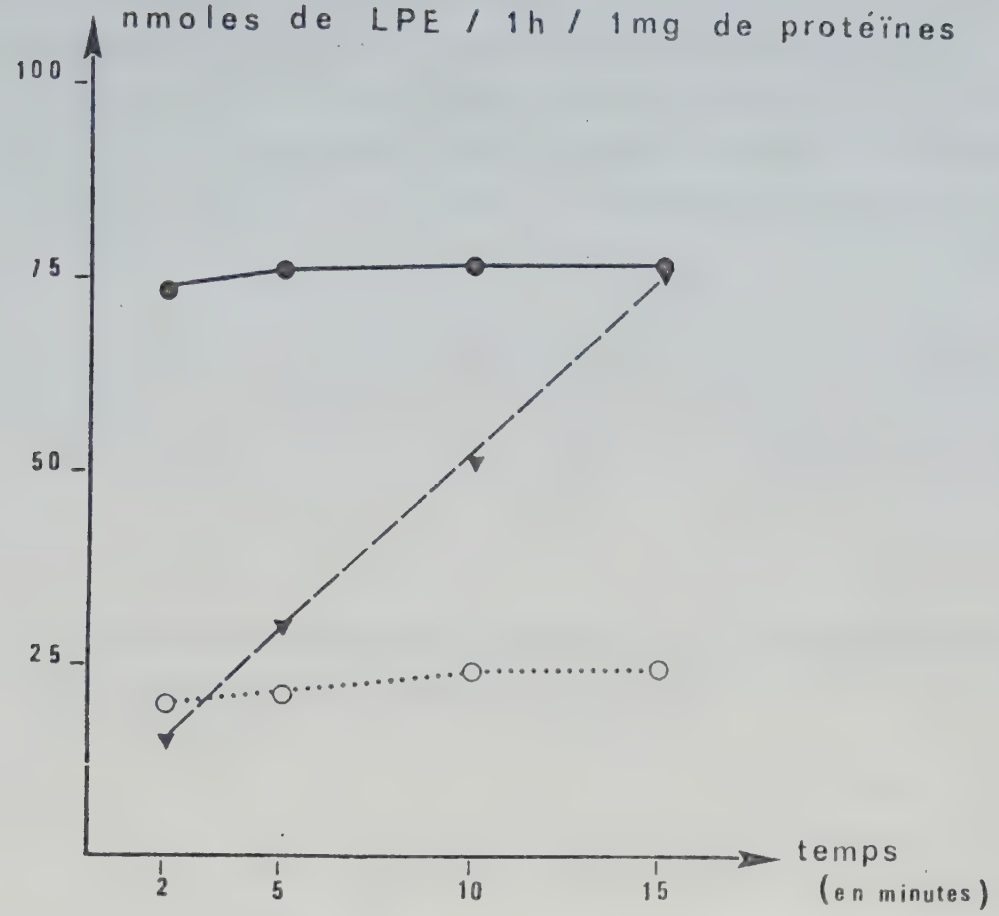
COMPARAISON DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE D'UN HOMOGENAT DE POUMON TRAITE OU NON PAR L'ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE

Activité phospholipasique d'un homogénat total

Activité phospholipasique d'un homogénat total traité par un lysat plaquettaire

Les conditions d'incubation sont celles décrites sous la figure 5.

FIGURE 7



ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES DE L'AORTE APRES INJECTION DU LYSAT PLAQUETTAIRE PARTIELLEMENT PURIFIE

Activité phospholipasique de la fraction soluble d'homogénat d'aorte de rat :

○····○····○ témoin ayant reçu une injection d'1 ml de solution de sérum physiologique : -sans activation

—●—●—●— " " : -après activation in vitro par le lysat de plaquettes

▼—▼—▼ traité ayant reçu une injection d'1 ml d'un extrait contenant 1,5 mg. de protéines plaquettaires

Chez le rat, le plasma riche en plaquettes, le sérum et le lysat du caillot contiennent une phospholipase active importante, alors que le plasma dépourvu de plaquettes et les globules rouges renferment principalement une phospholipase activable par un facteur contenu dans les plaquettes de cet animal et qui peut agir sur ces phospholipases soit in vitro, au cours de la coagulation, ou après injection ; dans ce dernier cas, nous obtenons une activation rapide mais incomp et temporaire.

L'aorte et le poumon renferment également les deux formes de cette enzyme, principalement la forme activable ; par injection, la phospholipase de l'aorte e activée plus lentement que les phospholipases sanguines mais totalement.

II - ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES SANGUINES ET TISSULAIRES HUMAINES PAR L'ACTIVATEUR D'ORIGINE PLAQUETTAIRE DU RAT

Nous avons cherché à mettre en évidence si le facteur contenu dans le lysat plaquettaire de rat était spécifique des phospholipases sanguines et tissulaires du rat ou s'il était capable d'activer également celles d'autres espèces, princi palement celles de l'homme.

A/ des phospholipases sanguines

a. in vitro

Chez l'homme, nous avons observé que le plasma et le lysat de globules roug n'ont qu'une faible activité phospholipasique ; il en est de même pour le sérum le lysat de plaquettes.

Contrairement à ce que nous avions observé chez le rat, la coagulation du sang humain ne s'accompagne pas de l'augmentation de l'activité phospholipasique Cependant, nous avons constaté que l'addition in vitro d'un lysat de plaquettes rat à un plasma, à un lysat de globules rouges, à un sérum ou à un lysat de pla- quettes d'homme fait apparaître une activité supplémentaire importante (tableau

T A B L E A U IV

	PHOSPHOLIPASES		
	ACTIVE	ACTIVEE	TOTALE
Sérum humain	40	2.960	3.000
Plasma humain	30	2.870	2.900
Lysat de globules rouges	20	13.980	14.000
Lysat de plaquettes humaines	12	75	87

Activation de la phospholipase sanguine humaine par un lysat de plaquettes de rat

L'expression des résultats et les conditions d'incubation sont celles décrites sous le tableau I.

Le lysat de plaquettes humaines est préparé dans les mêmes conditions que celles de plaquettes de rat. Il possède une faible activité phospholipasique mais, traité in vitro par un lysat de plaquettes de rat, il acquiert une activité supplémentaire (tableau IV).

Le lysat de plaquettes humaines renferme donc une phospholipase sous forme active et sous forme activable par un lysat de plaquettes de rat.

Ce tableau montre que les phospholipases sanguines de l'homme peuvent être activées in vitro par le facteur contenu dans les plaquettes de rat.

b. par coagulation

Pour celà, nous avons comparé l'activité phospholipasique de sérums obtenus par : coagulation spontanée (sérum I) et après recalcification d'un sang total recueilli sur anticoagulant (sérum II) et en présence de plaquettes de rat (sérum III) (tableau V).

Ce tableau montre que l'activateur des plaquettes de rat peut intervenir au cours de la coagulation d'un sang humain ; cette activation de la phospholipase plasmatique est totale ; l'addition in vitro de lysat plaquettaire de rat au sérum III ne faisant pas apparaître d'activité supplémentaire.

L'activateur contenu dans les plaquettes de rat peut donc activer les phospholipases plasmatiques et globulaires du sang humain au cours de la coagulation de ce dernier.

B/ des phospholipases tissulaires

Quelques dosages effectués sur des fractions solubles d'homogénats d'aortes et de poumons humains, prélevés quelques heures après la mort et préparés dans les mêmes conditions que celles du rat, font apparaître que ces tissus renferment une phospholipase active ainsi qu'une forme activable in vitro par un lysat plaquettaire de rat.

L'activateur contenu dans les plaquettes de rat est donc capable d'agir sur des phospholipases autres que celles du rat.

T A B L E A U V

	PHOSPHOLIPASES		
	ACTIVE	ACTIVEE	TOTALE
Plasma	40	3.860	3.900
Sérum I	40	3.660	3.700
Sérum II	50	3.950	4.000
Sérum III	4.000	0	4.000

Activation de la phospholipase plasmatique humaine par le lysat de plaquettes de rat au cours de la coagulation

Activité phospholipasique d'un plasma témoin et de sérums obtenus par coagulation :

Sérum I d'un sang total

Sérum II par recalcification d'un sang total recueilli sur anticoagulant

Sérum III par recalcification d'un sang humain en présence de plaquettes de rat

L'expression des résultats et les conditions d'incubation sont celles décrites sous le tableau I

III - ETUDE DU LYSAT DES PLAQUETTES SANGUINES DE RAT

Nous avons successivement étudié le facteur capable d'activer les phospholipases sanguines et tissulaires du rat et de l'homme et la phospholipase de type A_2 que nous avons mise en évidence dans le lysat de plaquettes de rat.

Pour cette étude, nous avons utilisé du lysat préparé par congélations et décongélations successives.

1 ml de lysat correspondant à 1 ml de plasma initial renferme 0,7 à 1 mg. de protéines ainsi que 0,15 à 0,25 mg. de phospholipides. Nous avons cherché à vérifier si la présence des phospholipides est indispensable à l'activation des phospholipases ; la délipidation par un mélange alcool-éther à - 20°C s'accompagne de la perte de ses propriétés activatrices, qui ne sont pas restaurées par refixation des phospholipides ; la délipidation provoque peut-être la dénaturation des protéines.

A/ mise en évidence de quelques propriétés

Les protéines activatrices du lysat :

ne sont pas dialysables

Une dialyse prolongée contre eau courante ne s'accompagne d'aucune perte d'activité.

sont de poids moléculaire élevé

Quel que soit le type de Séphadex utilisé pour sa purification, les protéines activatrices du lysat sont éluées en fin du volume mort de la colonne.

sont thermolabiles

Le lysat chauffé 10 min. à des températures comprises entre 50 et 70°C, garde ses propriétés activatrices pour les températures inférieures ou égales à 55°C ; elles diminuent au delà de cette température et sont détruites en totalité pour les températures égales ou supérieures à 60°C.

B/ étude de l'activité phospholipasique de type A_2 du lysat plaquettaire du rat

a. cinétique de l'activité

- en fonction du temps

Nous avons étudié la cinétique de la réaction en fonction du temps ; la durée d'incubation étant comprise entre 5 et 60 min. (figure 8).

La figure 8 montre que la vitesse de la réaction est constante pendant les 15 premières min. et atteint un plateau à partir de 30 min.

La vitesse initiale de la réaction est de 10 nanomoles de LPE formées en 1 min. par 1 mg. de protéines plaquettaires pendant les 15 premières min.

- en fonction du pH

Nous avons incubé le lysat de plaquettes en présence de substrat en milieu solution tampon tris-HCl 0,05 M à des pH compris entre 5 et 10 pendant 15 min. à 37°C (figure 9).

Cette figure montre que l'activité est maximale pour la zone de pH comprise entre 6,7 et 7,5, l'activité spécifique dosée étant de 500 à 600, elle est pratiquement nulle pour ceux inférieurs à 5 et présente un deuxième optimum plus faible pour la zone de pH allant de 9 à 10, l'activité spécifique obtenue pour ces pH étant de 200 à 300.

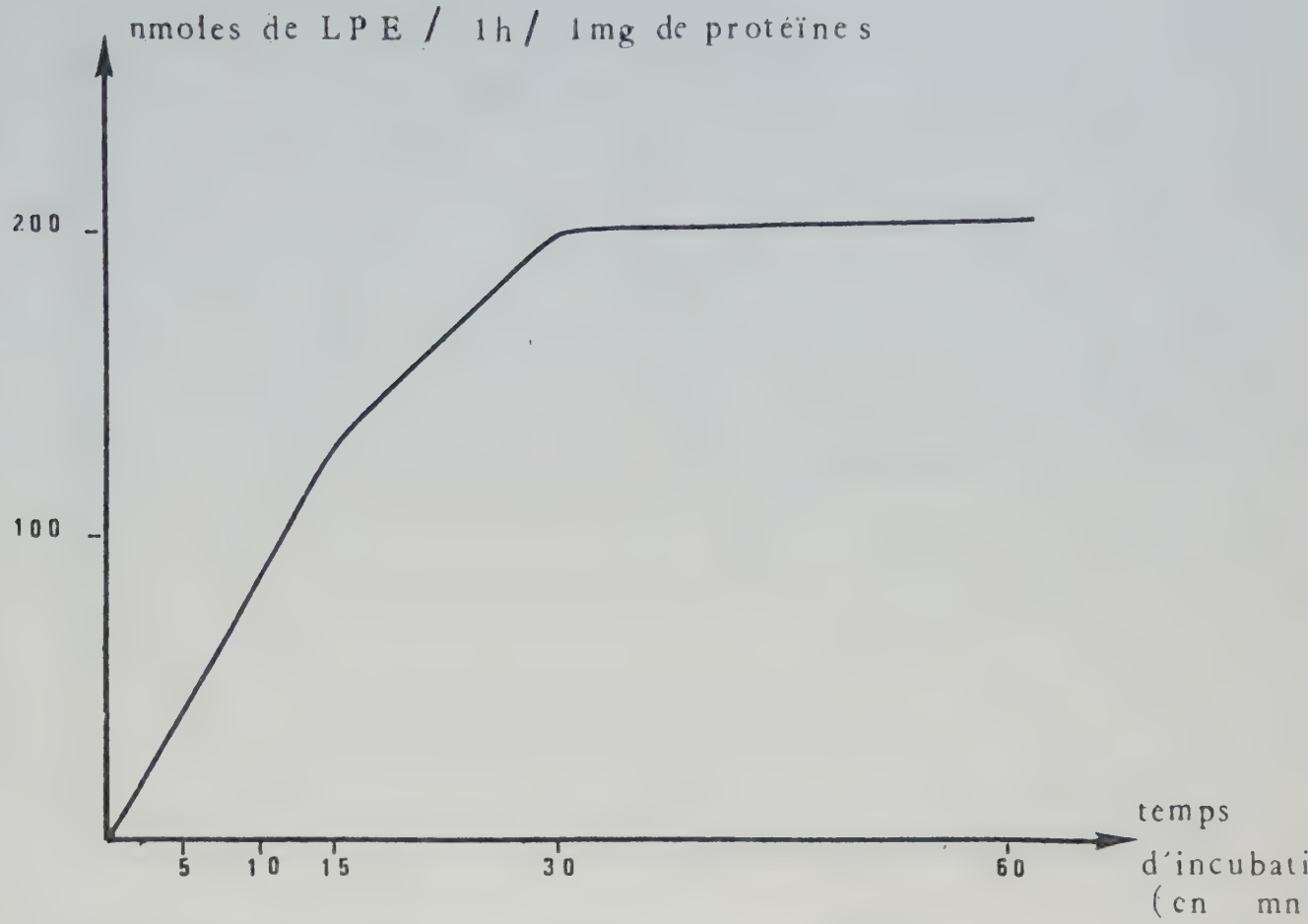
- en fonction des ions Ca^{2+}

Nous avons cherché à mettre en évidence si la phospholipase exigeait des ions Ca^{2+} pour agir ; pour celà, nous avons fait deux types d'expériences :

. en présence d'EDTA (Ethylène diamine tetraacétate) ;

. en introduisant des doses croissantes de $CaCl_2$ (figure 10).

FIGURE 8



ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES DE RAT EN FONCTION DU TEMPS

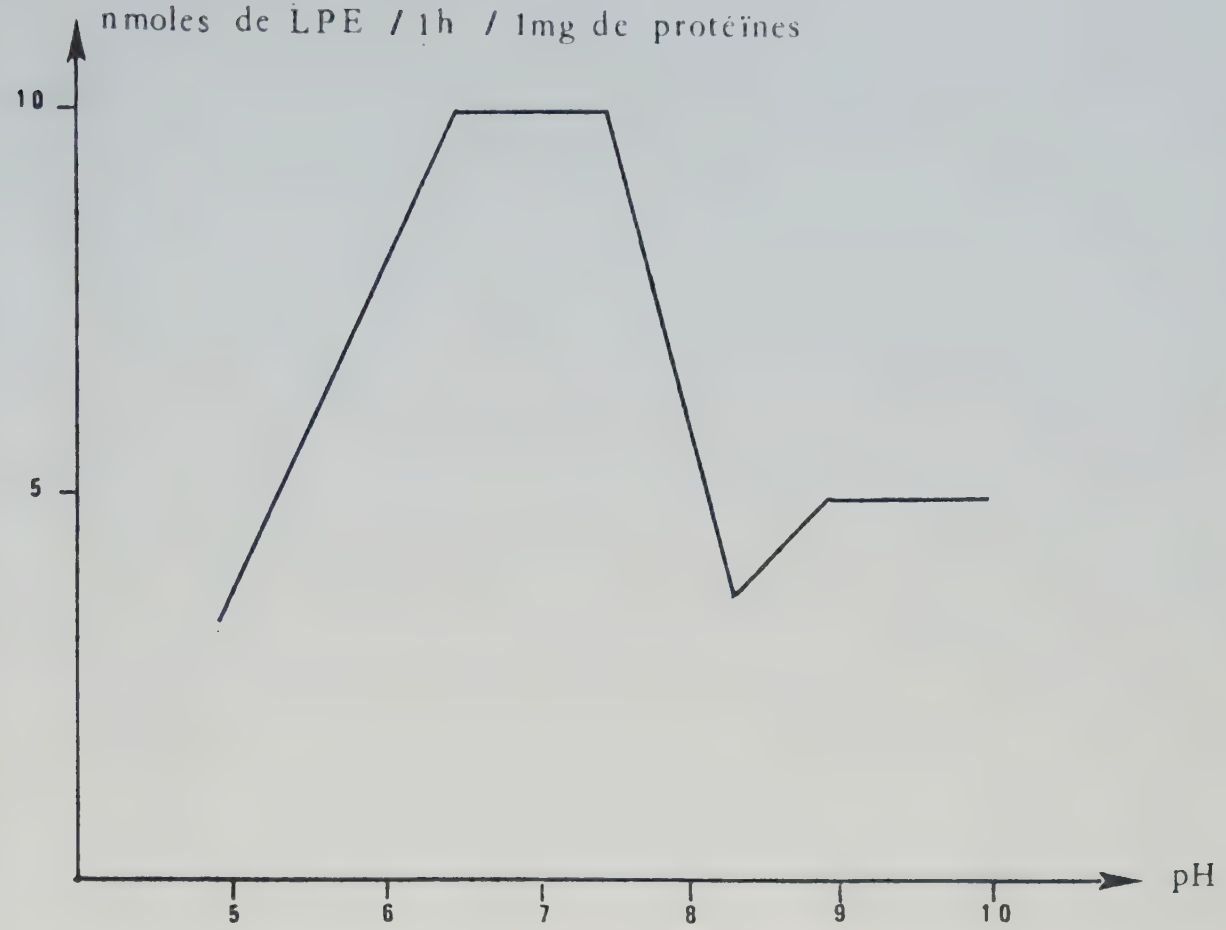
Conditions d'incubation :

32 nanomoles de PE marquées au ^{14}C incubées avec 20 µg de protéines plaquettaires en milieu solution tampon tris-HCl 0.05 M pH 7,2 en présence de $CaCl_2$ à une concentration finale de 10 mM dans un volume total de 2 ml.

en abscisse : les temps d'incubation de 5 à 60 mn.

en ordonnée : le nombre de nanomoles de LPE libérées par 1 mg. de protéines plaquettaires.

FIGURE 9



ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES DE RAT EN FONCTION DU pH

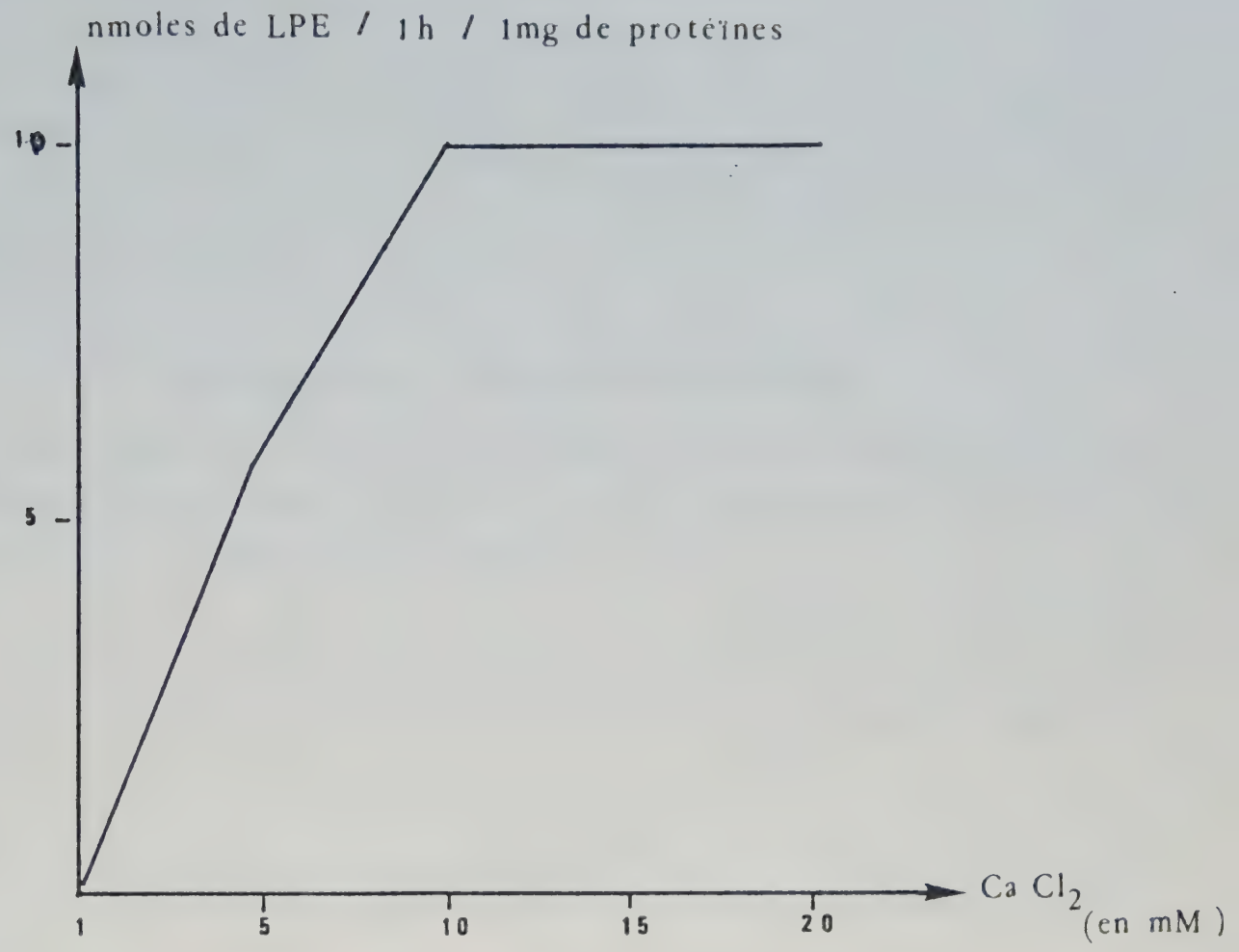
en abscisse : Les différents pH

en ordonnée : le nombre de nanomoles de LPE formées en 1 mn. par 1 mg. de protéines.

temps d'incubation : 15 mn. à 37°C

Les conditions d'incubation sont identiques à celles décrites sous la figure 8.

FIGURE 10



ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES DE RAT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN $CaCl_2$

en abscisse : concentration en ions Ca^{2+} variant de 1 à 20 mMol.

en ordonnée : le nombre de nanomoles de LPE formées en 1 mn et par 1 mg. de protéines plaquettaires.

temps d'incubation : 15 mn. à 37°C.

Les conditions d'incubation sont identiques à celles décrites sous la figure 8.

L'activité phospholipasique des plaquettes à pH 7,2 nécessite la présence d'ions Ca^{2+}, l'introduction d'EDTA dans le milieu d'incubation en quantité telle que la concentration finale soit 10 mM, inhibe complètement l'activité phospholipasique. Cette activité est optimale pour une concentration finale en $CaCl_2$ de 10 mM, un excès d'ions Ca^{2+} n'entraîne pas d'inhibition.

- en fonction de la concentration du substrat

Nous avons étudié l'action de la phospholipase en fonction de la concentration en substrat dans le milieu d'incubation (figure 11) que nous avons fait varier de 4 à 32 nanomoles de PE marquée au ^{14}C.

La vitesse maximale de la réaction est obtenue pour une concentration en substrat de l'ordre de 16 nanomoles, pour des concentrations supérieures à 25 nanomoles nous notons une inhibition de la réaction par excès de substrat.

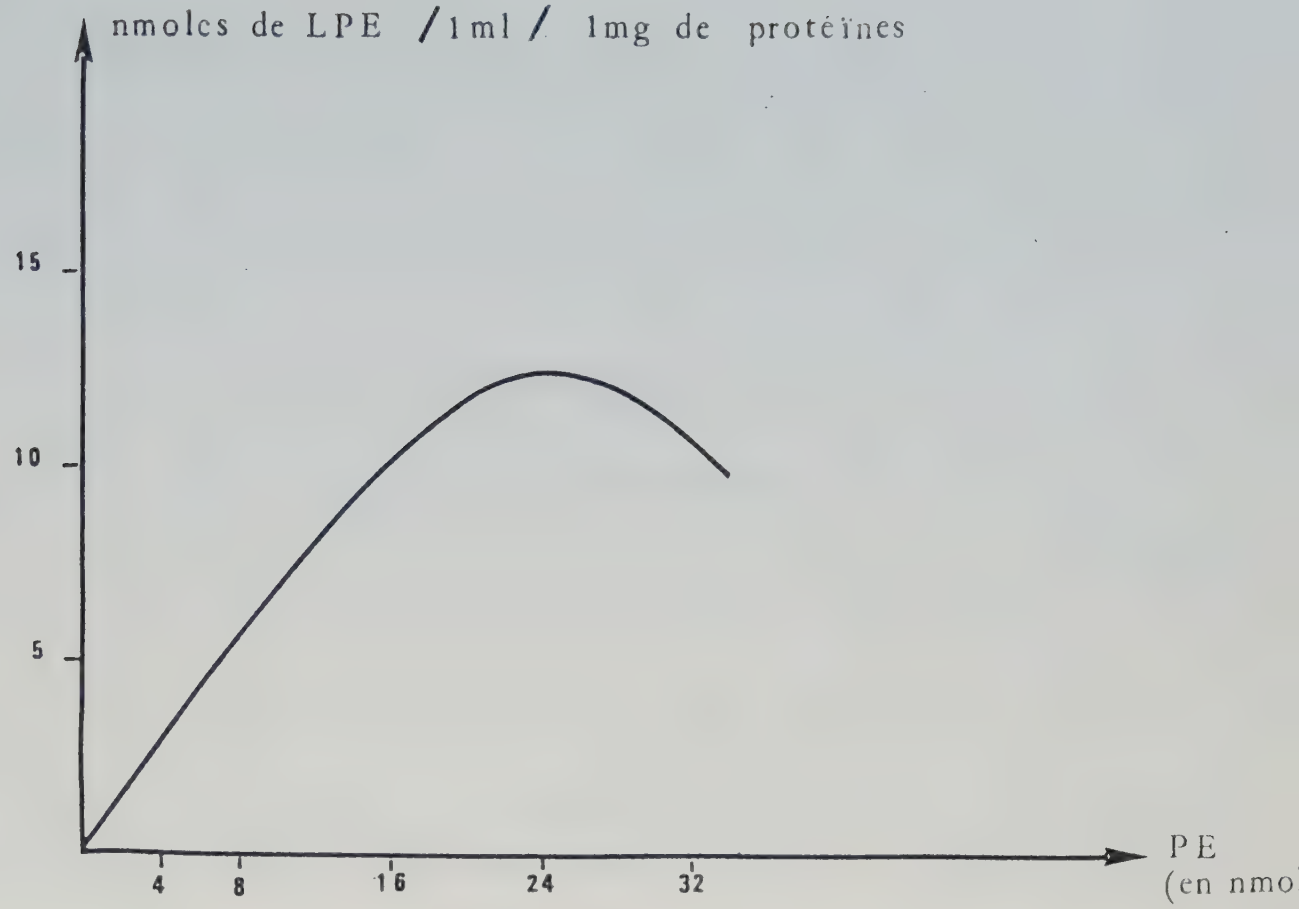
b. influence de la température

L'activité phospholipasique est conservée si le lysat de plaquettes est chauffé 10 min. à 55°C ; elle diminue pour des températures comprises entre 60 et 65°C. Elle disparaît complètement à 100°C.

c. action des détergents

Le desoxycholate de sodium et le dodécylsulfate n'activent pas la réaction et sont inhibiteurs au-dessus des concentrations finales de 0,02 p.100 dans le milieu réactionnel. Le triton X 100 est inhibiteur à très faible concentration de l'ordre de 0,01 p.100.

FIGURE 11



ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES DE RAT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

en abscisse : concentration en substrat variant de 4 à 32 nanomoles.

en ordonnée : nombre de nanomoles de LPE formées en 1 mn. par 1 mg. de protéines plaquettaires

Les conditions d'incubation sont identiques à celles décrites sous la figure 8.

d. action sur substrat spécifique

L'utilisation de PE marquée en position 2 par l'acide linoléique ^{14}C a montré que l'activité phospholipasique des plaquettes sanguines de rat que nous mesurons à pH 7,2 est de type A_2 : après 15 min. d'incubation avec le lysat de plaquettes, l'hydrolyse de ce substrat spécifique après 15 mn d'incubation avec le lysat de plaquettes met en évidence par chromatographie une dégradation au profit des acides gras libres, celle en LPE restant comparable à celle du témoin.

C/ purification partielle du lysat de plaquettes de rat

a. fractionnement sur colonne de Séphadex G 100

Le lysat en milieu solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) est fractionné sur une colonne de Séphadex G 100 éluée par la même solution tampon.

La courbe d'élution montre que nous obtenons deux pics (figure 12).

Pour chacun des deux pics et des interpics, nous dosons les protéines et localisons l'activateur et la phospholipase.

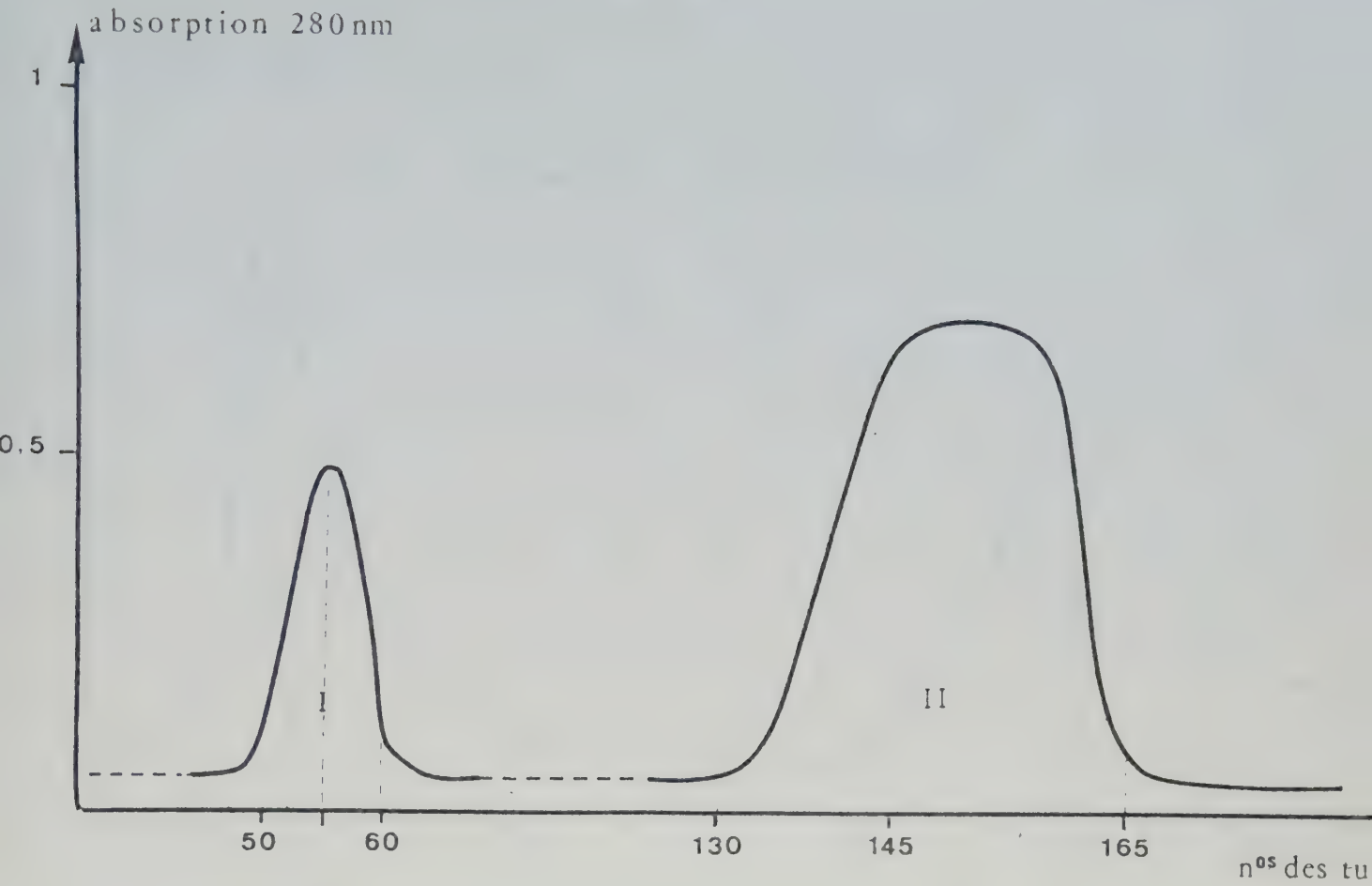
Les protéines du pic I éluées dès la fin du volume mort de la colonne représentant environ le tiers des protéines totales déposées, sont seules capables d'activer la phospholipase plasmatique, elles possèdent également l'activité phospholipasique de type A_2 des plaquettes.

Ce fractionnement sur Séphadex G 100 permet une purification partielle du lysat total en éliminant environ 70 % des protéines, mais ne permet pas de dissocier la phospholipase de l'activateur qui sont recueillis dans le même pic. Cette dissociation peut être obtenue par un fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 63 (figure 13).

b. fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B

Les protéines du pic I du fractionnement sur colonne de Séphadex G 100 sont introduites sur une colonne de Blue Sépharose CL 6B et éluées successivement par une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2), puis par la même solution tampon enrichie en NaCl à concentration 1 M.

FIGURE 12



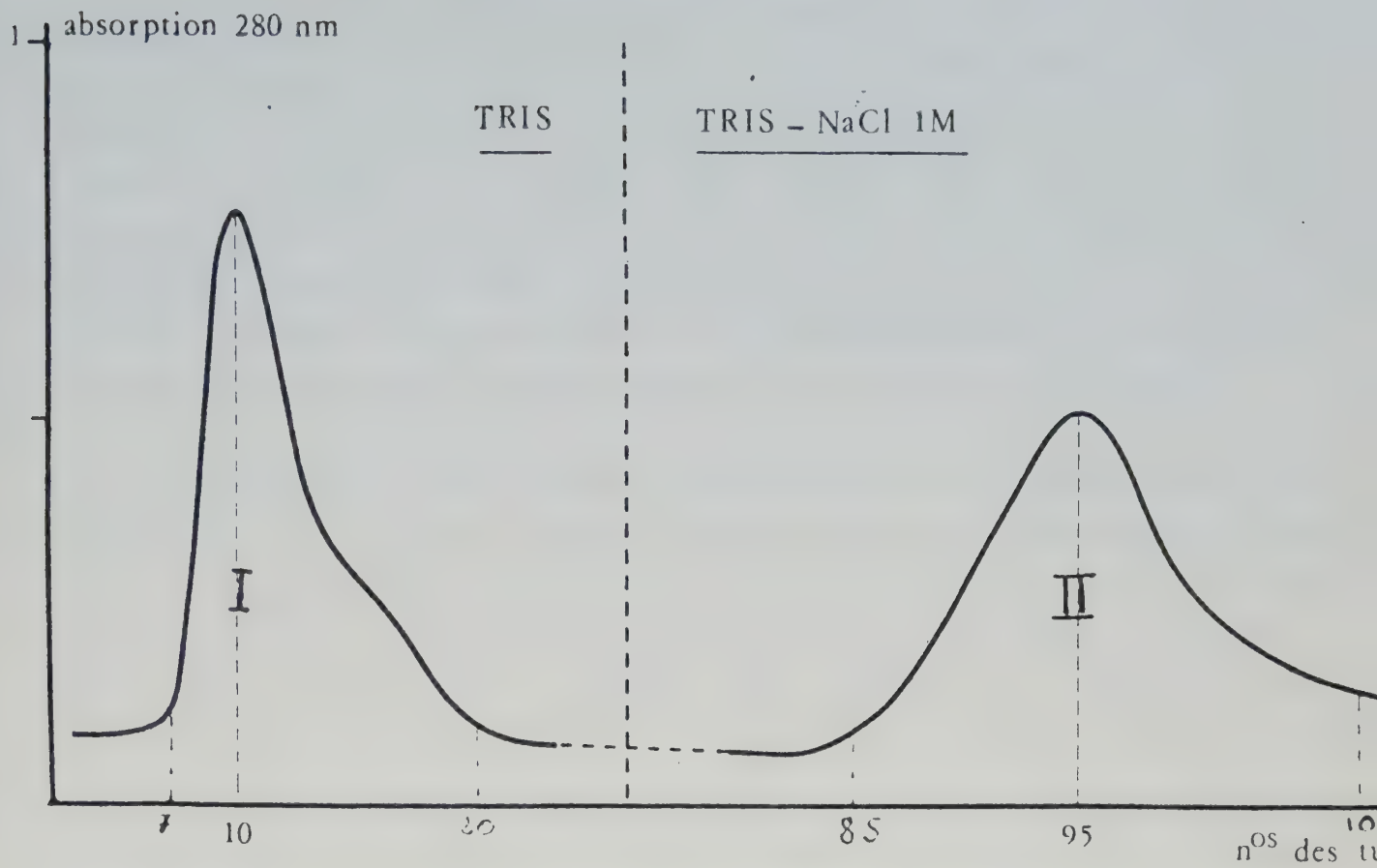
FRACTIONNEMENT DU LYSAT PLAQUETTAIRE SUR COLONNE DE SEPHADEX G 100

100 mg. de protéines plaquettaires dissoutes dans 10 ml de la solution tampon tris-HCl 0.05 M (pH 7,2) sont fractionnées sur une colonne de Séphadex G 100 $K_{26/100}$.

L'élution est faite par le même tampon. Les fractions sont recueillies par 6,5 ml.

en abscisse : les numéros de tubes
en ordonnée : les densitées optiques
longueur d'ondes de lecture : 280 nm.

FIGURE 13



FRACTIONNEMENT DU LYSAT PARTIELLEMENT PURIFIE SUR COLONNE DE BLUE SEPHAROSE CL 6B

50 mg. de protéines plaquettaires partiellement purifiées par un fractionnement sur colonne de Séphadex G 100, en solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) sont fractionnées sur Colonne de Blue Sépharose CL 6B $K_{9/30}$

L'élution est faite successivement par le tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) puis par ce tampon enrichi en NaCl à concentration 1 M. Les fractions sont recueillies par 0,7 ml.

La figure 13 montre que nous obtenons un pic pour chacun des éluants. Les protéines du pic I éluées par la solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) représentant 25 à 30 % des protéines déposées ne renferment environ que 15 % de l'activité phospholipasique du lysat partiellement purifié ; celles du pic II éluées par la solution tampon enrichie en NaCl à concentration 1 M n'en possèdent aucune. En mélangeant les protéines des pics I et II, nous faisons apparaître une activité supplémentaire, complémentaire de l'activité phospholipasique du pic I (tableau VI). Nous avons vérifié que les protéines du pic I traitées in vitro par un lysat de plaquettes acquièrent une activité phospholipasique supplémentaire et que celles du pic II sont capables d'activer une phospholipase plasmatique.

Ce tableau montre que l'activité phospholipasique des protéines du pic I est optimale quand nous traitons 1 mg de protéines de ce pic par 0,05 mg de celles du pic II, l'activité spécifique de la phospholipase est de 1200, celle de l'activateur est de 18000 ; dans le lysat les protéines activatrices sont donc en excès par rapport à la phospholipase à activer ce qui explique que cet excès d'activateur libéré au cours de la coagulation, puisse activer les phospholipases sanguines.

Nous avons obtenu, par ce fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B, la dissociation de l'activateur et des deux formes de la phospholipase du lysat.

L'activité phospholipasique de type A_2, que nous dosons dans le lysat de plaquettes, est due pour environ 15 % à la phospholipase active et à une phospholipase activable, activée par l'activateur présent dans le lysat de plaquettes de rat.

IV - ETUDE DES PHOSPHOLIPASES PLASMATIQUE ET SERIQUE ; MISE EN EVIDENCE DU MODE D'ACTION DE L'ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE

Nous avons montré que le plasma contenait une phospholipase activable et le sérum une phospholipase active.

Les deux formes de l'enzyme sont isolées à partir du plasma ou du sérum, par une précipitation à l'aide d'une solution de $(NH_4)_2SO_4$ saturée à chaud et neutralisée à pH 7,2.

T A B L E A U VI

	PROTEINES en mg	PHOSPHOLIPASE		ACTIVATEUR	
		a.s.	a.t.	a.s.	a.t.
Lysat plaquettaire total	100				
Lysat partiellement purifié	14	650	9.100	1.200	168.000
Eluats colonne de Blue Sépharose					
Pic I (tris)	4	190	760	0	0
Pic II (Tris NaCl 1 M)	6	0	0	16.000	96.000
mélange { 1mg. Pic I / 0,005 Pic II		1.200	4.800	18.000	108.000

Fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL6B du lysat de plaquettes de rat partiellement purifié

L'expression des résultats et les conditions d'incubation sont celles décrites sous le tableau I.

La phospholipase activable du plasma est localisée dans le surnageant du précipité de 33 à 50 % de saturation, elle précipite avec l'albumine au cours de l'acidification du surnageant à pH 4. Sa récupération est d'environ 90 % de la phospholipase inactive contenue dans le plasma.

La phospholipase active dosée directement est localisée dans le précipité de 33 à 50 % de saturation, le rendement obtenu est de 70 à 75 % de la phospholipase totale dosée dans le sérum.

A/ purification de la phospholipase activable du plasma

La solution d'albumine renfermant la phospholipase activable est purifiée successivement par un fractionnement à l'aide de colonne de Séphadex G 100, puis de Blue Sépharose CL 6B.

a. fractionnement sur colonne de Séphadex G 100

La solution d'albumine en milieu solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) enrichie en NaCl à concentration 0,75 M est fractionnée sur une colonne de Séphadex G 100 éluée par le même tampon (figure 14).

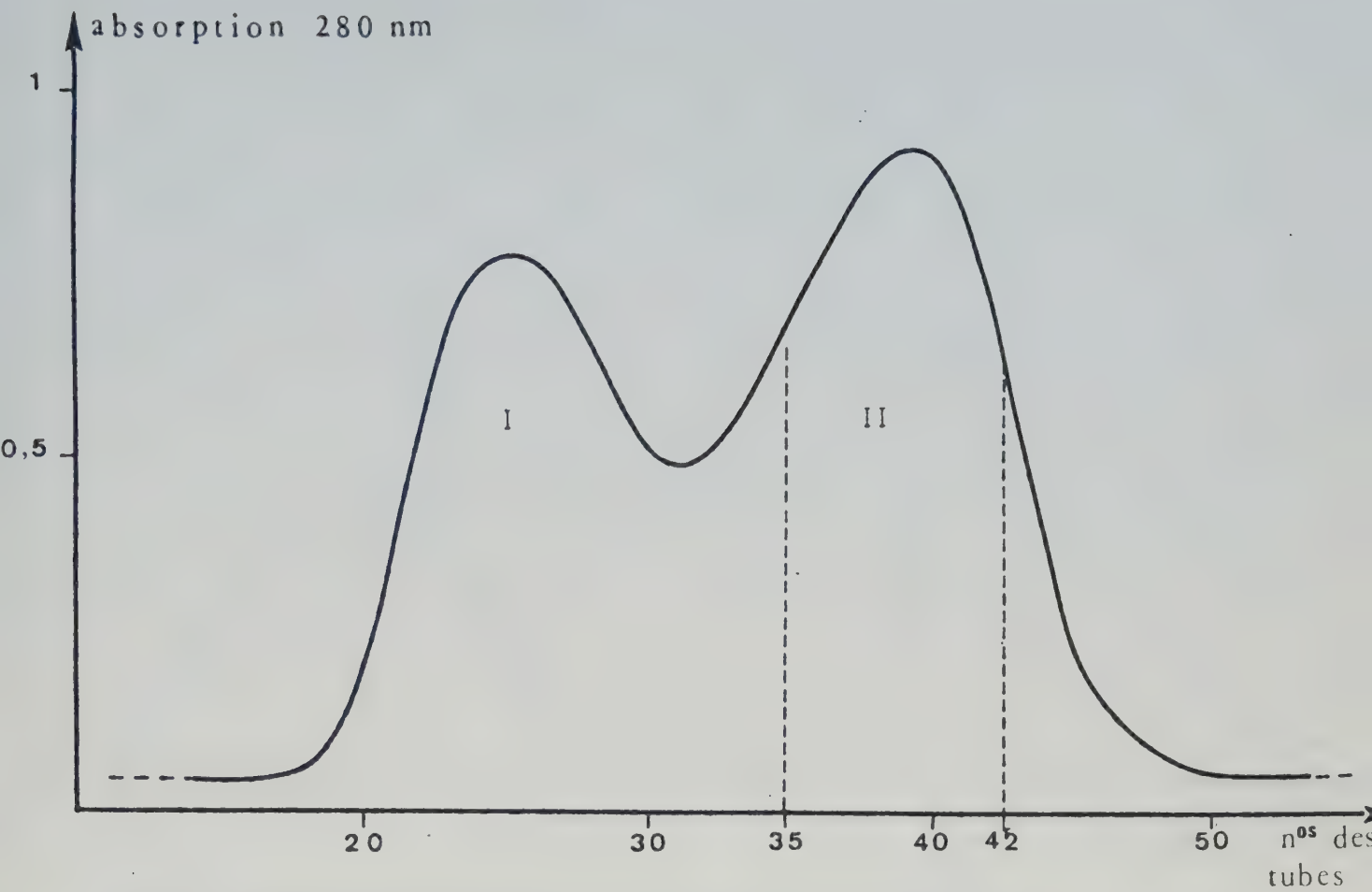
La figure 14 montre qu'il apparaît deux pics contigus, les protéines de chaque fraction sont dosées ainsi que leur activité phospholipasique en présence de lysat plaquettaire.

La deuxième fraction qui représente 50 à 60 % des protéines totales de l'extrait déposé, renferme la presque totalité de la phospholipase activable du plasma.

b. fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B

Les protéines du pic II après concentration et solubilisation dans une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) sont déposées sur une colonne de Blue Sépharose CL 6B et sont successivement éluées par la même solution tampon que l'extrait, puis par cette solution tampon enrichie en NaCl à concentration 1 M (figure 15).

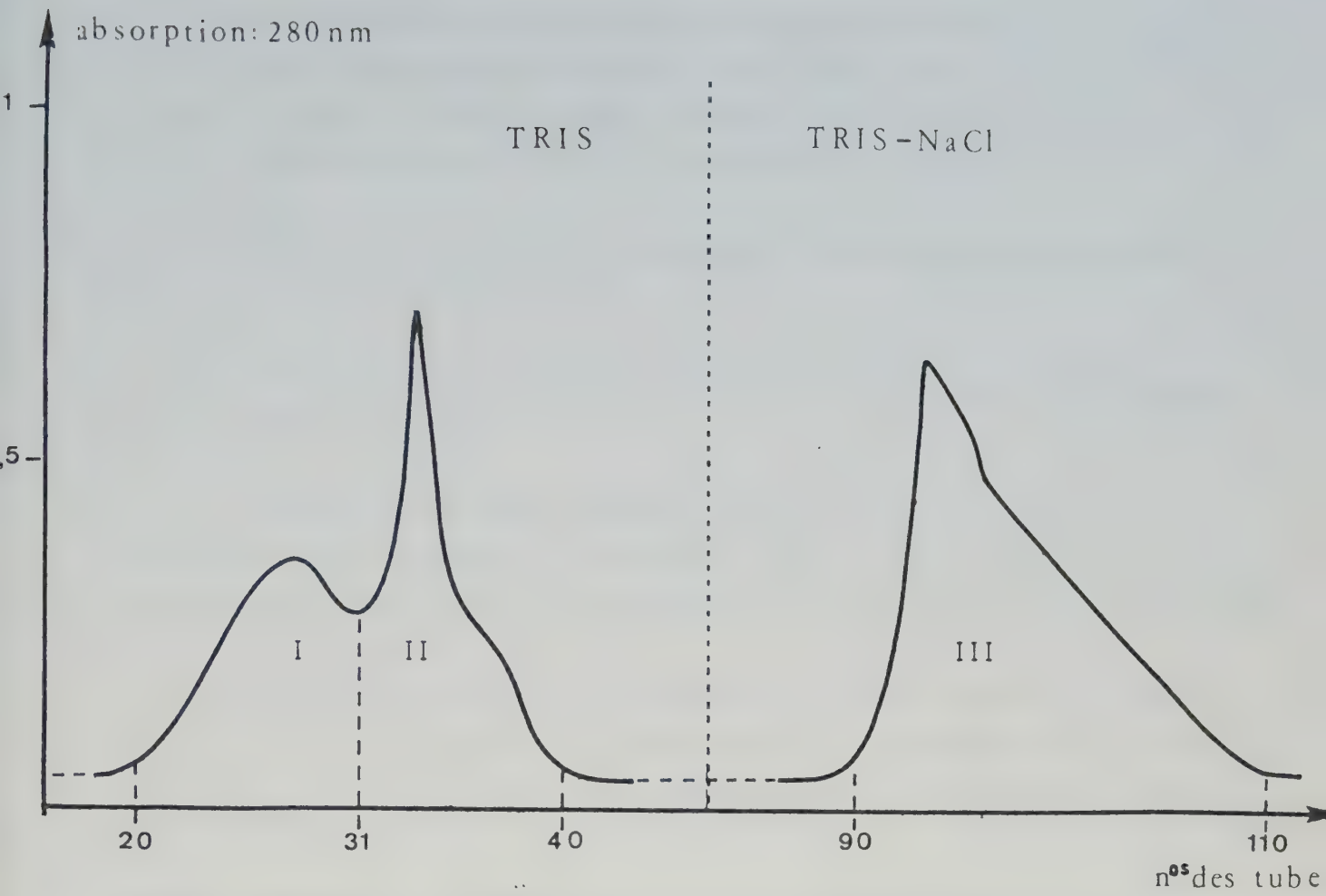
FIGURE 14



FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G 100 DE LA SOLUTION DU PRECIPITE D'ALBUMINE

200 mg. du précipité d'albumine dissous dans la solution tampon tris-HCl 0.05 M (pH 7,2) NaCl 0,75 M sont fractionnés sur une colonne de Séphadex G 100 de 2,5 cm. de diamètre et 100 cm. de haut. L'élution est effectuée avec le même tampon. Les fractions sont recueillies par 6,5 ml.

FIGURE 15



COURBE D'ELUTION DE LA PHOSPHOLIPASE ACTIVABLE PARTIELLEMENT PURIFIEE SUR UNE COLONNE DE BLUE SEPHAROSE CL 6B

100 mg. de protéines de la fraction II obtenue après Séphadex G 100 sont fractionnés sur une colonne de Blue Sépharose CL 6B de 0,9 cm. de diamètre et 60 cm. de hauteur. L'élution est faite successivement par une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) puis la même solution enrichie en NaCl à concentration 1 M. Chaque fraction est recueillie par 2 ml.

La courbe de fractionnement sur Blue Sépharose CL 6B du pic d'albumine préalablement fractionnée sur Séphadex G 100, montre que deux pics sont successivement élués par la solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) et un par la même solution tampon contenant du NaCl à concentration 1 M (figure 15).

La phospholipase activable du plasma est exclusivement dosée dans le pic II, élué par le premier tampon.

Le pic III élué par la solution tampon contenant le NaCl 1 M, renferme principalement l'albumine.

La confirmation de cette séparation presque totale de la phospholipase activable et de l'albumine la contaminant, nous est donnée par électrophorèse, qui nous montre que le pic II ne renferme plus que de faibles traces d'albumine.

Par ce fractionnement sur Blue Sépharose CL 6B de la solution d'albumine du plasma, nous avons pu séparer la phospholipase de l'albumine avec un rendement de 60 à 70 % et un coefficient de purification de 10 par rapport au plasma. (tableau VII).

B/ <u>purification de la phospholipase active du sérum : mise en évidence du mode d'action de l'activateur plaquettaire</u>

Les essais de purification de la phospholipase active du sérum sur colonne de Séphadex G 100 n'ayant pas donné satisfaction, nous avons fractionné la solution du précipité de 33 à 50 % du sérum en milieu tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) directement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B éluée successivement par une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2), puis par la même solution tampon enrichie en NaCl à concentration 1 M (figure 16).

La courbe d'élution montre que chaque tampon élue un pic. Les protéines des pics I et II ne possèdent pas d'activité phospholipasique, le mélange de prises aliquotes de chaque pic restaure cette activité.

Le fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B a donc dissocié la phospholipase active en deux protéines inactives, qui le deviennent quand elles sont présentes l'une et l'autre dans le milieu d'incubation (tableau VIII).

T A B L E A U VII

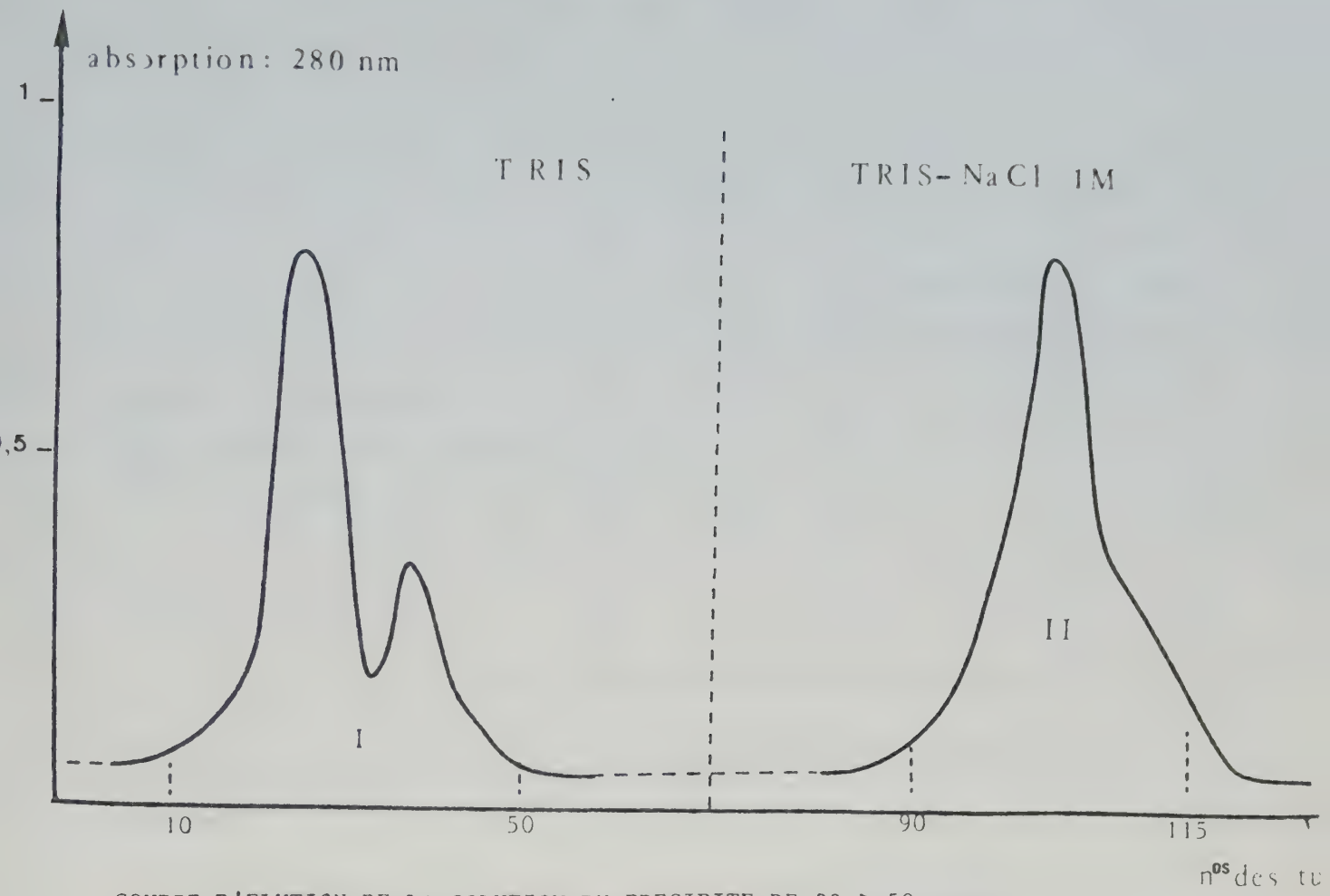
	PROTEINES en mg.	ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE	
		SPECIFIQUE	TOTALE
Plasma	1.200	40	48.000
Albumine	235	180	42.000
Après fractionnement			
- Sur Séphadex G 100	100	360	36.000
- Sur Blue Sépharose CL6B	40	500	20.000

Purification partielle de la phospholipase activable du plasma

L'expression des résultats et les conditions d'incubation sont celles décrites sous le tableau I.

La phospholipase activable est dosée avant et après activation par un lysat de plaquettes.

FIGURE 16



COURBE D'ELUTION DE LA SOLUTION DU PRECIPITE DE 33 à 50 p.cent DE SATURATION DU SERUM SUR COLONNE DE BLUE SEPHAROSE CL 6B

100 mg. de protéines du précipité de 33 à 50 p.cent dissous dans une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) sont déposés sur une colonne de Blue Sépharose CL 6B de 0,9 cm. de diamètre et 60 cm. de hauteur ($K_{9}/_{60}$).

L'élution est faite successivement par une solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) puis par la même solution enrichie en NaCl à concentration 1 M. Les fractions sont recueillies par 2 ml.

T A B L E A U VIII

	PROTEINES en mg.	ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE	
		SPECIFIQUE	TOTALE
Solution de globulines	100	160	16.000
Eluats colonne Blue Sépharose CL6B			
Pic I (tris)	44	0	0
Pic II (tris-NaCl 1 M)	50	0	0
Mélange { 1 mg pic I / 1 mg pic II		140	12.300 *

Dissociation de la phospholipase active du sérum en deux protéines inactives

L'expression des résultats et les conditions d'incubation sont celles décrites sous le tableau I.

* cette activité totale est obtenue en multipliant l'activité spécifique par 2 x 44, soit la totalité du pic I et une quantité équivalente du pic II.

Les protéines des fractions I et II ont été additionnées de lysat de plaquette de rat qui renferme l'activateur et de plasma qui possède la phospholipase activable

Seules les protéines du pic I sont activées par le facteur plaquettaire, elles se comportent comme celles de la phospholipase activable du plasma, par contre les protéines du pic II sont capables d'activer la phospholipase du plasma ; elles agissent donc comme les protéines activatrices d'origine plaquettaire.

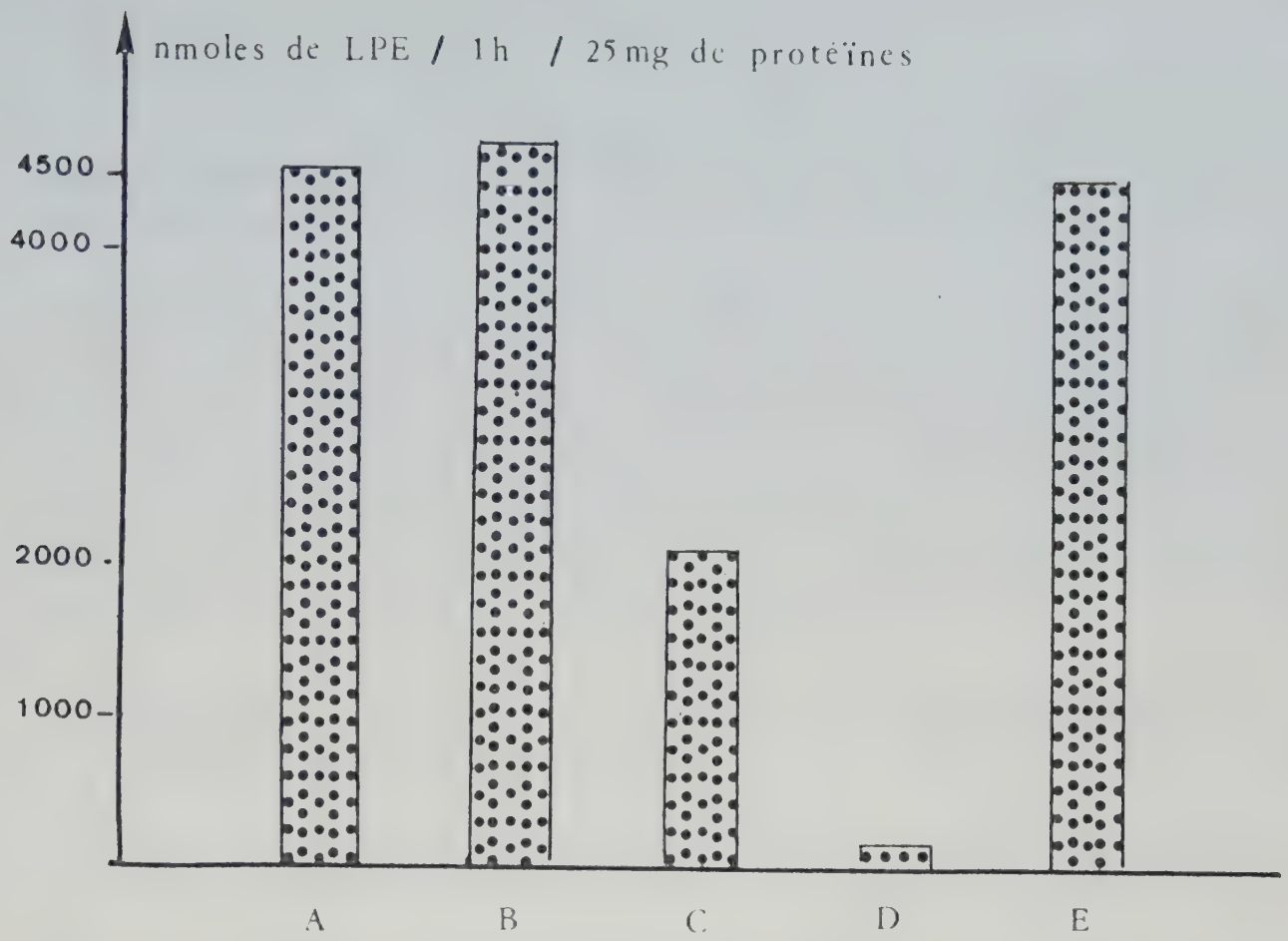
Afin de déterminer le rapport : phospholipase activable/activateur, nous avons fait agir sur 1 mg de protéines de la fraction I des doses croissantes de celles de la fraction II, nous obtenons l'activité optimale quand 1 mg des protéines est traité par 1 mg approximativement, de celle du pic II ; la répartition des protéines dans les deux pics étant sensiblement égale, il semblerait que dans la phospholipase active du sérum il n'y ait qu'un faible excès d'activateur et que la phospholipase plasmatique soit en totalité activée au cours de la coagulation par la lyse plaquettaire.

La phospholipase active du sérum résulte donc de l'association de deux protéines inactives : l'une d'origine plasmatique, l'autre d'origine plaquettaire.

Lors de l'étude du lysat de plaquettes, nous avons mis en évidence que l'activateur qu'il renferme était stable chauffé 10 min. à 50°C et qu'au delà, ses propriétés diminuent avec l'élévation de la température pour disparaître complètement à 60°C, alors que la phospholipase activable plasmatique chauffée 10 min. à 60° C conserve son activité. Cette différence de sensibilité à la chaleur de ces deux protéines nous a permis de confirmer la double origine de la phospholipase sérique.

En soumettant la solution du précipité de 33 à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium à un chauffage de 10 min. à des températures comprises entre 45 et 60°C, nous avons constaté, comme le montre la figure 17, que la solution du précipité conserve son activité phospholipasique intacte pour des températures inférieures ou égales à 50°C, qui, avec l'élévation de température, diminue pour disparaître à 60°C et que l'introduction de lysat de plaquettes dans le milieu réactionnel la restaure dans son intégralité. Au cours du chauffage, seule la protéine d'origine plasmatique a résisté alors que celle d'origine plaquettaire a été détruite ; l'addition dans le milieu d'un lysat de plaquettes a permis à l'association, responsable de l'activité phospholipasique, de se reformer.

FIGURE 17



ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LA PHOSPHOLIPASE SERIQUE

25 mg. de protéines du précipité de 33 à 50 p.cent du sérum dissous dans 5 ml de solution tampon tris-HCl 0.05 M (pH 7,2) sont chauffés 10 mn. aux températures indiquées ci-dessous.

A	sans chauffage	
B	chauffés 10 mn. à	50°C
C	" "	55°C
D	" "	60°C
E	" "	60°C puis additionnés d'un extrait de lysat plaquettaire de rat partiellement purifié correspondant à 0,15 mg, de protéines.

Cela confirme donc que la phospholipase active isolée du sérum dans le précipité de 33 à 50 % de saturation en sulfate d'ammonium, est bien due à l'association de deux protéines d'origine différente.

Cette association réalisée au cours de la coagulation peut être obtenue in vitro, par action d'un lysat plaquettaire partiellement purifié sur une phospholipase activable.

Un mélange de 80 mg de protéines de phospholipase activable plasmatique et de 1 mg de protéines de l'activateur est fractionné à l'aide d'une colonne de Blue Sépharose CL 6B dans les mêmes conditions que la solution du précipité de 33 à 50 % isolé du sérum. L'allure de la courbe d'élution est identique à celle de la figure 16 et montre la dissociation des deux protéines inactives ; la solution tampon tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) éluant la phospholipase activable et le même tampon contenant du NaCl 1 M éluant l'activateur.

Localisation, au cours du fractionnement par le sulfate d'ammonium, des deux formes de la phospholipase

Nous avons montré que le passage de la phospholipase de la forme activable à la forme active au cours de la coagulation, s'accompagne du changement de localisation de l'enzyme mis en évidence par le fractionnement du plasma ou du sérum, par une solution de sulfate d'ammonium saturée à chaud et neutralisée. La phospholipase activable isolée du plasma accompagnant l'albumine, alors que celle active isolée du sérum précipite principalement avec les globulines.

Ce changement de localisation lié à la forme de l'enzyme peut s'expliquer soit par des modifications intervenues au cours de la coagulation, soit à la présence de l'activateur.

Pour vérifier la première hypothèse, un sérum a été préparé par recalcification d'un mélange de plasma et de globules rouges débarrassés de leurs plaquettes. Le sérum obtenu ne possède que l'activité du plasma et peut être activé in vitro par un lysat de plaquettes. La précipitation par une solution de sulfate d'ammonium montre que la phospholipase activable accompagne l'albumine ; quand il y a coagulation en absence de l'activateur plaquettaire, la phospholipase reste sous forme activable et se comporte comme celle du plasma ce qui avait déjà été démontré précédemment.

Il semblerait que la présence de l'activateur soit responsable du changement de localisation. Pour le confirmer, nous avons précipité :

- un sérum préparé par recalcification d'un plasma riche en plaquettes ;
- un plasma additionné de lysat plaquettaire.

La phospholipase active est principalement localisée dans le précipité de 33 à 50 % de saturation, donc avec les globulines.

Ces résultats confirment que la localisation différente de deux formes de la phospholipase n'est pas due à une modification intervenue au cours de la coagulation, mais à l'association de la phospholipase activable avec l'activateur qui se forme au cours de la coagulation ou in vitro.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

ACTION DE L'ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE DE RAT SUR LES PHOSPHOLIPASES SANGUINES ET MEMBRANAIRES DU RAT ET D'AUTRES ESPECES

Les premiers travaux effectués sur le sang de rat, dans le laboratoire par Paysant et coll, avaient mis en évidence une phospholipase active dans le lysat de globules rouges (57) et le plasma (58) ainsi qu'une forme inactive pouvant être démasquée par action in vitro d'une solution de trypsine brute (Sigma).

Par ailleurs, Etienne et coll montraient que le sérum de rat possédait une phospholipase active (24) et que le lysat de plaquettes sanguines du rat renfermait un facteur de nature protéinique capable d'agir in vitro sur les phospholipases activables du plasma et des globules (18) ; ces derniers résultats nous ont donc amenés à mettre en doute la présence d'une phospholipase active dans le plasma et les globules rouges ; en effet, nous avons constaté que seule la forme activable de l'enzyme y est présente, elle est partiellement activée au cours des préparations par les plaquettes contaminantes. Le caillot, comme le sérum, possède la forme active de l'enzyme.

Le rôle de ce facteur plaquettaire au cours de la coagulation a pu être mis en évidence par l'étude comparative de sérums et de caillots obtenus par coagulation spontanée ou par recalcification de sang total recueilli sur anticoagulant avant et après élimination des plaquettes ; pour ceux préparés en présence des plaquettes, il apparaît une phospholipase active, alors que ceux obtenus en absence de plaquettes ne possèdent qu'une faible activité phospholipasique si ce n'est nulle. Les plaquettes sont donc indispensables pour qu'il y ait activation des phospholipases sanguines ; il faut en outre qu'elles soient lysées pour que le facteur activateur qu'elles renferment soit libéré et puisse agir. La coagulation entraîne la lyse des plaquettes et permet ainsi l'activation de la forme activable de l'enzyme dans le plasma et dans les globules rouges.

Nous avons constaté un enrichissement de la phospholipase sérique aux dépens de celle du caillot dès les premières minutes de la coagulation et qui se poursuit pendant plusieurs heures. La phospholipase sérique a donc une double origine : plasmatique et globulaire (26).

Dans les homogénats d'aorte et de poumons nous avons, comme d'autres auteurs(22,55), montré la présence d'une phospholipase active, mais nous y avons également mis en évidence une forme activable par le lysat de plaquettes(27,53). Il est possible que tout ou partie de l'activité phospholipasique directement dosable résulte de l'action des plaquettes lysées au cours du lavage des organes et de la préparation des extraits. L'élimination totale des plaquettes est donc indispensable pour doser séparément la phospholipase active et la phospholipase activable. Les deux formes de l'enzyme peuvent être détachées des membranes par l'introduction lors de leur broyage d'une solution de NaCl à une concentration minimale de 0,5 M ; cette solubilisation est reversible puisque l'élimination du sel, par dialyse de l'homogénat total, entraîne la refixation des deux formes de l'enzyme sur les membranes.

L'activateur plaquettaire partiellement purifié injecté à l'animal provoque également l'activation des phospholipases sanguines et de l'aorte (28) ; elle est rapide, incomplète et temporaire dans le cas de la phospholipase plasmatique alors qu'elle n'apparaît que quinze minutes après l'injection, qu'elle est totale et qu'elle semble plus durable quand il s'agit de la phospholipase de l'aorte; les difficultés à maintenir l'animal en vie plus de trente minutes après l'injection n'ont pas permis de poursuivre l'expérimentation au-delà de ce temps.

Il est d'autre part vraisemblable que l'injection de ce facteur activateur provoque l'activation des phospholipases membranaires d'autres organes.

L'activateur plaquettaire du rat peut également agir sur des phospholipases sanguines et membranaires d'autres espèces, celles de l'homme en particulier. Chez ce dernier, le sérum et le plasma n'ont qu'une faible activité phospholipasique, mais renferment une phospholipase activable in vitro aussi bien par l'activateur des plaquettes de rat que par celui accompagnant la trypsine brute (Sigma) préparée à partir du pancréas de porc (25).

MODE D'ACTION DE L'ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE

La mise en évidence d'une forme activable de la phospholipase dans le plasma ayant été faite en traitant celui-ci par une solution de trypsine brute (Sigma), nous avions supposé que l'action du facteur plaquettaire était comparable à celle de la trypsine et qu'il y avait transformation d'un précurseur en enzyme par protéolyse mais notre étude a montré que ce n'était pas la trypsine elle-même qui intervenait (31) mais des protéines activatrices présentes dans l'échantillon de trypsine impure.

Pour élucider le mode d'action de l'activateur, nous avons comparé la phospholipase active du sérum et la phospholipase activable du plasma partiellement purifiées et isolées préalablement par une solution de sulfate d'ammonium : la phospholipase sérique précipite avec les globulines alors que la forme activable du plasma accompagne l'albumine.

Par fractionnement sur colonne de Blue Sépharose des globulines isolées du sérum et qui renferment la phospholipase active, nous avons séparé deux fractions protéiniques inactives mais qui, mélangées, possèdent une activité phospholipasique ; nous avons pu établir que l'une était d'origine plasmatique et l'autre d'origine plaquettaire (30). Les protéines activatrices d'origine plaquettaire étant en quantité suffisante pour activer les protéines plasmatiques. Dans le sérum, c'est cette association de deux protéines qui détermine l'activité phospholipasique. Si l'une des protéines est détruite, par exemple par la chaleur, l'association n'existe plus et l'activité phospholipasique disparaît.

C'est cette association qui est responsable du changement de la localisation de l'une ou l'autre des formes de l'enzyme au cours du fractionnement du sérum ou du plasma par $(NH_4)_2SO_4$.

Il est vraisemblable que chaque fois que cet activateur fait apparaître une activité, c'est en s'associant avec des protéines inactives ce qui peut expliquer son action sur les phospholipases activables sanguines ou membranaires autres que celles du rat.

ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES DE RAT

Dans le lysat de plaquettes de rat, nous n'avons dosé qu'une activité phospholipasique de type A_2 (29), nos conditions opératoires ne nous ayant pas permis d vérifier la présence d'une phospholipase de type A_1 ; il est cependant possible qu'un fractionnement subcellulaire des plaquettes sanguines du rat, identique à celui utilisé par Trugnan et coll (68) pour celles de l'homme, nous permette de la mettre en évidence.

L'activité phospholipasique des plaquettes de l'homme (63, 64, 65), et d'un certain nombre d'animaux, notamment le lapin (45) et le cheval (5,) a été étudiée elle résulte le plus souvent de l'action des phospholipases A_1 et A_2. A notre connaissance, la présence d'un activateur de la phospholipase n'a jamais été signal (Song S.Y. et coll (66) ont montré que les plaquettes humaines renferment un activateur de la lipoprotéine lipase).

La présence simultanée du facteur activateur et de la phospholipase active dans le lysat plaquettaire partiellement purifié nous a amenés à rechercher si cette activité phospholipasique dosée était due à une phospholipase directement active ou résultait également, comme pour le sérum, de l'association de deux protéines ; le fractionnement sur colonne de Blue Sépharose de l'extrait plaquettaire partiellement purifié nous a permis de séparer les deux formes de la phospholipase, de l'activateur.

La forme active ne représentant qu'environ 15 p.cent de la phospholipase totale qui est dosée, l'activité phospholipasique restante résulte de l'association de la forme activable et de l'activateur.

MODALITES D'ACTIVATION DES PHOSPHOLIPASES

Les modalités d'activation des phospholipases A_2 ont fait l'objet de nombreux travaux. Un certain nombre d'entre eux étudient l'action des enzymes protéolytiques principalement la trypsine qui a notamment permis à de Haas et coll de mettre en évidence puis d'isoler du pancréas de porc (15), de boeuf (70), de cheval (32) et de mouton (21) une phospholipase A_2 et son précurseur, mécanisme d'activati que nous avions nous-mêmes envisagé.

L'activateur le plus important des phospholipases A_2 est le Ca^{2+} ainsi que les protéines qui le fixent, telle la calmoduline (77), qui jouent un rôle important dans l'activité de ces enzymes.

D'autres protéines peuvent être nécessaires à l'action des phospholipases A_2, comme Elsbach et coll (46) l'ont démontré dans le cas de la phospholipase A_2 des leucocytes de lapin qui ne peut agir sur les phospholipides d'Escherichia coli qu'en présence de protéines intervenant sur la perméabilité cellulaire. Hassid et Lévine (40) ont constaté que la mélittine, peptide membranaire du venin d'abeille, augmente l'activité phospholipasique d'Escherichia coli.

Le mode d'activation que nous avons mis en évidence dans le sérum de rat semble particulièrement intéressant dans le cas des phospholipases plaquettaires. Différents auteurs ont montré que dans les plaquettes la phospholipase A_2 (10, 16, 75), comme la phospholipase C (4, 5, 12, 52), joue un rôle primordial dans la synthèse des thromboxanes et des protaglandines, notamment chez le rat (74), puisq ces enzymes libèrent de l'acide arachidonique, le précurseur de cette synthèse à partir des phospholipides.

Certains, comme Blackwell (7), envisagent une activation de la phospholipase A_2 au cours de l'agrégation plaquettaire. Il est possible que l'association de protéines observée dans les plaquettes de rat corresponde à ce type d'activation qui est réversible puisque les protéines la composant peuvent être dissociées, elle permet donc une régulation de l'action des phospholipases. Il serait intéressant de savoir si certaines affections de l'agrégation plaquettaire agissent en permettant l'association d'une phospholipase et d'un activateur.

Les protéines activatrices des plaquettes de rat semblent jouer un rôle de cofacteur, leur présence déterminant l'activité phospholipasique normalement dans les plaquettes mais aussi dans le plasma et les globules rouges. Le rôle de cette activation in vivo mériterait peut-être aussi d'être étudié.

CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les plaquettes sanguines de rat renferment un facteur, libéré au cours de la coagulation par la lyse plaquettaire, capable d'activer in vitro les phospholipases plasmatiques et globulaires. La coagulation provoquée en l'absence de plaquettes n'est pas accompagnée d'activation.

L'étude des deux formes de l'enzyme dans le sérum et le plasma a permis d'établir que c'est la présence de l'activateur qui est responsable du changement de localisation au cours du fractionnement par $(NH_4)_2SO_4$; la phospholipase sérique active accompagne les globulines, la phospholipase inactive du plasma est fortement liée à l'albumine.

Le fractionnement sur colonne de Blue Sépharose CL 6B permet de dissocier la phospholipase active du sérum en deux protéines inactives : l'une d'origine plasmatique, l'autre d'origine plaquettaire.

C'est l'association de deux protéines inactives qui fait apparaître l'activité phospholipasique. Cette association qui se forme au cours de la coagulation pour le sérum peut être reproduite in vitro en mélangeant une phospholipase inactive et l'activateur partiellement purifié. Cette association est réversible, il est possible de la rompre soit par fractionnement sur Blue Sépharose CL 6B, soit par chauffage , la phospholipase inactive étant moins thermosensible que l'activateur

L'activateur d'origine plaquettaire peut agir sur les phospholipases tissulaires du rat, notamment celles de l'aorte et du poumon.

L'injection dans l'aorte de ce facteur partiellement purifié provoque l'activation rapide, incomplète et temporaire des phospholipases sanguines et celle plus lente mais totale des phospholipases aortiques.

Cet activateur agit également sur les phospholipases sanguines, artérielles et pulmonaires de l'homme.

L'étude du lysat de plaquettes montre que l'activateur est de nature protéique, de poids moléculaire élevé et thermolabile.

Le lysat de plaquettes possède une activité phospholipasique de type A_2 présentant deux zones de pH optimum : l'une comprise entre 6,7 et 7,5, l'autre plus faible, comprise entre 9 et 10.

La phospholipase plaquettaire nécessite la présence d'ions Ca^{2+} dans le milieu d'incubation, un excès n'est pas inhibiteur, la vitesse de réaction est constante pendant les quinze premières minutes, un excès de substrat est inhibiteu

L'activité phospholipasique reste stable lorsque l'enzyme est chauffée 10 min à 55°C ; elle diminue ensuite et est détruite en totalité à 100°C. L'activité phospholipasique est sensible à la présence de détergent à très faible concentrati

Les fractionnements successifs sur colonne de Séphadex G 100 et sur colonne de Blue Sépharose CL 6B du lysat de plaquettes de rat permettent de montrer que l'activité phospholipasique est due à l'action de phospholipases directement actives et de phospholipases résultant de l'association de deux protéines.

BIBLIOGRAPHIE

1 APITZ-CASTRO, R.J., MAS, M.A., CRUZ, M.R. and JAIN, M.K..
Isolation of homogeneous phospholipase A_2 from human platelets.
Biochim. Biophys. Res. Commun. (1979) 91 : 63-71

2 BAGGIO, B., FAVARO, S., ANTONELLO, A., BORIN, A. and BORSATTI, A..
Phospholipase A_2 in the rat kidney
Subcellular localization and possible physiological function
Renal Physiol. Basel. (1978) 1 : 323-328

3 BELLEVILLE, J. and CLEMENT, J..
Comparative activity of pancreatic and pancreatic juice phospholipase A on lipoprotein-bound phospholipid in egg yolk and phospholipids extracted from egg yolk.
C.R. Acad. Sci. Paris. (1968) 266 : 959-964

4 BEREZIAT, G..
Are phospholipases involved in platelet activation ?
Agents and Actions (1979) 9 : 390-399

5 BILLAH, M.M., LAPETINA, E.G. and CUATRECASAS, P..
Phospholipase A_2 and phospholipase C activities of platelets.
J. Biol. Chem. (1980) 255 : 10227-10231

6 BILLAH, M.M., LAPETINA, E.G. and CUATRECASAS, P.,
Phospholipase A_2 activity - specific for phosphatidic acid
J. Biol. Chem. (1981) 256 : 5399-5403

7 BLACKWELL, G.J..
Phospholipase A_2 and platelet aggregation.
Adv. Prostagland. Thromboxane Res. (1978) 3 : 137-142
Edited by C.GALLY et al.-Raven Press - New York

8 BONNEFIS, M-J., REY, G., THOUVENOT, J-P. et DOUSTE-BLAZY, L..
Phospholipase de l'intestin de rat : mode d'action
Biochimie (1977) 59 : 355-361

9 BRETON-BITRAN, M..
Activité phospholipasique des globules rouges humains.
Thèse de Doctorat d'Université ORSAY (1973)

10 BROEKMAN, J., WARD, J.W. and MARCUS, A.J..
Phospholipid metabolism in stimulated human platelets.
J. Clin. Invest. (1980) 66 : 275-283

11 CHANAN SINGH, RAMESH, V. and ANJANEYULU, K..
A comparative study of serum phospholipase A_2 in man and animals. Some biochemical and physiological implications.
Ind. J. Exper. Biol. (1979) 17 : 50-57

12 CHAP, H. and DOUSTE-BLAZY, L..
Réaction de libération plaquettaire induite par la phospholipase C.
Eur. J. Biochem. (1974) 48 : 351-355

13 CHAP, H., PERRET, B., MAUCO, G., SIMON, M.F. and DOUSTE-BLAZY, L..
Organisation and role of platelet membrane phospholipids as studied with purified phospholipases
Agents and Actions (1979) 9 : 400-406

14 COLARD-TORQUEBIAU, O., BEREZIAT, G. and POLONOVSKI, J..
Etude des phospholipases A des membranes plasmiques du foie de rat.
Biochimie (1975) 57 : 1221-1227

15 De HAAS, G.H., POSTEMA, N.M., NIEUWENHURZE, W. and Van DEENEN, L.L.M..
Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas.
Biochim. Biophys. Acta. (1968) 159 : 118-123

16 DERKSEN, A. and COHEN, P..
Patterns of fatty acid release from endogenous substrates by human platelets homogenates and membranes.
J. Biol. Chem. (1975) 250 : 9342-9347

17 De WOLF, M., HILDERSON, H.J., LAGROU, A. and DIERICK, W.
Phospholipase A_2 from bovine thyroid lysosomes
Arch.Internat.Physio. Biochem. (1977) 85 : 969-971

18 DUCHESNE, M.J., ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Action des plaquettes sur la phospholipase plasmatique.
Biochimie (1972) 54 : 257-260

19 DURAND, S., CLEMENTE, F., LLOVERAS, J., THOUVENOT, J.P. et DOUSTE-BLAZY, L..
Activité phospholipasique A spontanée de l'homogénat de pancréas de rat.
C.R. Acad.Sci. Paris (1977) 284 : 1357-1366

20 DURAND, S., CLEMENTE, F. and DOUSTE-BLAZY, L..
A non-secretory phospholipase A_2 in the rat pancreas.
Biomedecine (1980) 33 : 19-21

21 DUTILH, C.E., Van DOREN, P.J., VERMEUL, F.E.A.M. and De HAAS, G.H..
Isolation and properties of phospholipase A_2 from ox and sheep pancreas.
Eur. J. Biochem. (1975) 53 : 91-97

22 EISENBERG, S., STEIN, Y. and STEIN, O..
Phospholipases in arterial tissue. - II Phosphatide acyl hydrolase and lysophosphatide acyl hydrolase activity in human and rat arteries.
Biochim. Biophys. Acta. (1968) 164 : 205-212

23 ELSBACH, P., WEISS, J., FRANSON, R.C., BECKERDITE-QUAGLIATES, SCHNEIDER, A. and HARRIS, L..
Separation and purification of a potent bactericidal/Permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A_2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. (1979) 254 : 11000-11009

24 ETIENNE, J., GRUBER, A., and POLONOVSKI, J..
Phosphatidyléthanolamine phospholipase A_2 du sérum de rat.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1967) 49 : 1751-1759

25 ETIENNE, J., PAYSANT, M., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Présence d'un précurseur de phospholipase dans le sérum humain normal.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1969) 51 : 709-716

26 ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Apparition dans le sérum de rat d'une activité phospholipasique d'origine érythrocytaire au cours de la coagulation : Rôle des plaquettes.
Paroi Artérielle - Arterial wall (1973) I : 119-123

27 ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Phospholipase et prophospholipase de l'aorte chez le rat.
Paroi Artérielle - Arterial wall (1973) I : 169-172

28 ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Activation in vivo des prophospholipases sanguines et artérielles par un activateur d'origine plaquettaire.
Bull. Soc. de Biol. (1976) 170 : 1159-1166

29 ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
L'activité phospholipasique A_2 des plaquettes de rat.
Biochimie (1979) 61 : 433-435

30 ETIENNE, J., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Activité phospholipasique A_2 du sérum de rat. Association de deux protéines.
Biochim. Biophys. Acta. (1980) 619 : 693-698

31 ETIENNE, J., BRETON, M., GRUBER, A. et POLONOVSKI, J..
Activation des phospholipases sanguines par un activateur qui accompagne la trypsine brute.
Biochimie (1980) 62 : 723-726

32 EVENBERG, A., MEYER, H., VERHEIJ, M. and DE HAAS, G.H..
Isolation and properties of prophospholipase A_2 and phospholipase A_2 from horse pancreas and horse pancreas juice.
Biochim. Biophys. Acta. (1977) 491 : 265-274

33 FOLCH, J., LEES, M. and SLOAN STANLEY, G.H..
Simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. (1957) 226 : 497-503

34 FRANSON, R., PATRIARCA, P. and ELSBACH, P..
Phospholipid matabolism by phagocytic cells. phospholipase A_2 associated with rabbit polymorphonuclear leukocyte granules.
J. Lipids Res. (1974) 15 : 380-388

35 FRANSON, R., WEISS, J., MARTIN, L., SPITZNAGEL, J.K. and ELSBACH, P..
Phospholipase A activity associated with the membranes of human polymorphonuclear leukocytes.
Biochem. J. (1977) 167 : 839-841

36 GALLAI-HATCHARD, J.J. and THOMPSON, R.H.C..
Phospholipase A activity of mammalian tissues
Biochim. Biophys. Acta. (1965) 98 : 128-136

37 GATT, S. and BARENHOLZ, Y..
Enzymes of complex lipid metabolism.
Annu. Rev. Biochem. (1973) 42 : 61-90

38 GILLETT, M.P.T., COSTA, E.M. and OWEN, J.S..
Evidence for active phospholipase A in mouse plasma.
Biochim. Biophys. Acta. (1980) 617 : 237-244

39 GRIEVE, S.A. and LIGGINS, G.C..
Phospholipase A activity in human and ovine uterine tissues.
Prostaglandins (1976) 12 : 229-241

40 HASSID, A. and LEVINE, L..
Stimulation of phospholipase activity and prostaglandin biosynthesis by melittin in cell. culture and in vivo.
Res. Commun. Chem. Path. Pharm. (1980) 18 : 507-517

41 HIGASHI, Y., KURIMARA, T., KUWAHARA, O., OZAKI, O. and AMANO, T..
Studies on the role of plakin X effect on membrane phospholipids.
Biken J. (1963) 6 : 111-126

42 HIRATA, F..
The regulation of lipomodulin, a phospholipase inhibitory protein in rabbit neutrophils by phosphorylation.
J. Biol. Chem. (1981) 256 : 7730-7733

43 JESSE, R.L. and FRANSON, R.C..
Modulation of purified phospholipase A_2 activity from human platelets by calcium and indomethacin.
Biochim. Biophys. Acta. (1979) 575 : 467-470

44 JIMENO-ABENDAÑO, J. and ZAHLER, P..
Purified phospholipase A_2 from sheep erythrocyte membrane. Preferential hydrolysis according to polar groups and 2-acyl chains.
Biochim. Biophys. Acta. (1979) 573 : 266-275

45 KANNAGI, R. and KOIZUMI, K..
Phospholipid - Deacylating enzymes of rabbit platelets.
Arch. Biochem. Biophys. (1979) 196 : 534-542

46 KAPLAN-HARRIS, L., WEISS, J., MOONEY, C., BECKERDITE-QUAGLIATA, S. and ELSBACH, P..
The action of human and rabbit serum phospholipase A_2 on Escherichia coli phospholipids.
J. Lipid Res. (1980) 21 : 617-623

47 KATES, M..
Lipid Metabolism (1960)
(ed. Bloch, K.) John Wiley and Sons, New York.

48 KRAMER, R.M., WÜTHRICH, C., BOLLIER, C., ALLEGRINI, P.R. and ZAHLER, P..
Isolation of phospholipase A_2 from sheep erythrocyte membranes in the presence of detergents.
Biochim. Biophys. Acta. (1978) 507 : 381-394

49 KUNZE, H., NAHAS, N. and WURL, M..
Phospholipases in human seminal plasma.
Biochim. Biophys. Acta. (1974) 348 : 35-44

50 LAPETINA, E.G., BILLAH, M.M. and CUATRECASAS, P..
The phosphatidylinositol cycle and the regulation of arachidonic acid production.
Nature (1981) 292 : 367-369

51 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J..
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. (1951) 193 : 265-275

52 MAUCO, G., CHAP, H. and DOUSTE-BLAZY, L..
Characterization and properties of a phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C) from platelet cytosol.
F.E.B.S. lett. (1979) 100 : 367-370

53 MELIN, B., MAXIMILIEN, R., FRIENLANDER, G., ETIENNE, J. et ALCINDOR, L.G..
Activités phospholipasiques pulmonaires du foetus de rat. Variations au cours du développement.
Biochim. Biophys. Acta. (1977) 486 : 590-594

54 NEWKIRK, J.D. and WAITE, M..

Phospholipid hydrolysis by phospholipase A_1 and A_2 in plasma membranes and microsomes of rat liver.

Biochim. Biophys. Acta. (1973) 298 : 562-576

55 OHTA, M., HASEGAWA, H. and OHNO, K..

Calcium independent phospholipase A_2 activity in rat lung supernatant.

Biochim. Biophys. Acta. (1972) 280 : 552 558

56 OTTOLENGHI, A..

Preparation and characterization of mouse intestinal phospholipase.

Lipids. (1973) 8 : 415-425

57 PAYSANT, M., DELBAUFFE, D., WALD, R. et POLONOVSKI, J..

Action enzymatique des globules rouges de rat sur le phosphatidylglycérol.

Bull. Soc. Chim. Biol. (1967) 49 : 169-176

58 PAYSANT, M., BITRAN, M., ETIENNE, J. et POLONOVSKI, J..

Phospholipase A du plasma sanguin de rat. Cinétique et propriétés. Existence d'un précurseur inactif.

Bull. Soc. Chim. Biol. (1969) 51 : 863-873

59 PAYSANT, M., BITRAN, M., WALD, R. et POLONOVSKI, J..

Phospholipase A des globules rouges chez l'homme. Action sur les phospholipides endogènes et exogènes.

Bull. Soc. Chim. Biol. (1970) 52 : 1257-1269

60 PERRET, B., CHAP, H.J. and DOUSTE-BLAZY, L..

Asymetric distribution of arachidonic acid in the plasma membrane of human platelets. A determination using purified phospholipases and a rapid method for membrane isolation.

Biochim. Biophys. Acta. (1979) 556 : 434-446

61 PICKETT, W.C., JESSE, R.L. and COHEN, P..

Trypsin-induced phospholipase activity in human platelets.

Biochem. J. (1976) 160 : 405-408

62 RAHMAN, Y.E., CERNY, E.A. and PERAINO, C..
Purification and some properties of rat spleen phospholipase A.
Biochim. Biophys. Acta. (1973) 321 : 526-535

63 RITTENHOUSE-SIMMONS, S. and DEYKIN, D..
The activation by Ca^{2+} of platelets phospholipase A_2.
Biochim. Biophys. Acta. (1978) 543 : 409-422

64 SCHOENE, N.W. and IACONO, J.M..
Phospholipase A_2 activity in lysat human blood platelets.
Fed. Proc. (1974) 33 : 685-688

65 SMITH, J.B. and SILVER, M.J..
Phospholipase A_1 of human blood platelets.
Biochem. J. (1973) 131 : 615-618

66 SONG, S.Y., GARFINKEL, A.S. and SCHOTZ, M.C..
Activation of lipoprotein lipase by blood platelets.
Life Sciences. (1974) 15 : 103-110

67 TORQUEBIAU-COLARD, O., ETIENNE, J. and POLONOVSKI, J..
Etude des phospholipases membranaires ; nécessité d'un activateur présent dans les lysats plaquettaires.
C.R. Acad. Sci. Paris (1972) 275 : 2775-2777

68 TRUGNAN, G., BEREZIAT, G., MANIER, M.C. and POLONOVSKI, J..
Phospholipase activities in subcellular fractions of human platelets.
Biochim. Biophys. Acta. (1979) 573 : 61-72

69 Van den BOSCH, H. and Van DEENEN, L.L.M..
Chemical structure and biochemical significance of lysolecithins from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta. (1965) 106 : 326-337

70 Van Den BOSCH, H., AARSMAN, A.J. and Van DEENEN, L.L.M..
Isolation and properties of a phospholipase A_2 activity from beef pancreas.
Biochim. Biophys. Acta. (1974) 348 : 197-209

71 Van den BOSCH, H..
Phosphoglyceride metabolism.
Annu.Rev. Biochem. (1974) 43 : 243-277

72 Van den BOSCH, H..
Intracellular phospholipase A.
Biochim. Biophys. Acta. (1980) 604 : 191-246

73 VERGER, R. and de HAAS, G.H..
Interfacial enzyme kinetics of lipolysis.
Annu.Rev. Biophys. Bioeng. (1976) 5 : 77-117

74 VINCENT, J.E. and ZIJLSTRA, F.J..
Formation by phospholipase A_2 of prostaglandins and endoperoxides in platelets of normal and essential fatty acid-deficent rats.
Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research (1978) 3 : 143-146
Edited by C.GALLY et al.-Raven Press - New York

75 WATANATI, T. and NAIT, O.C..
Roles of phospholipases in platelet functions.
Taisha (1980) 17 : 337-350

76 WITTCOFF, H..
The Phosphatides (1951) 99-109
Reinhold, New York.

77 WONG, P.Y-K. and CHEUNG, W.Y..
Calmodulin stimulates human platelets phospholipase A_2.
Biochim. Biophys. Res. Commun. (1979) 90 : 473-480

78 ZIBOH, V.A. and LORD, J.T..
Phospholipase A activity in the skin.
Biochem J. (1979) 184 : 283-290